

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Prof. Dr. med. U. Laufs)

Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase in der Regulation des Stoffwechsels bei Myokardhypertrophie

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Matthias Lenski
geb. am 20.02.1983 in Zweibrücken

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	7
1.1	<i>AMP-aktivierte Proteinkinase inhibiert durch Angiotensin II hervorgerufene metabolische Veränderungen und Hypertrophie von Kardiomyozyten</i>	<i>7</i>
1.2	<i>AMP-activated proteinkinase reverses metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with Angiotensin II</i>	<i>8</i>
2	Einleitung	10
2.1	<i>Mechanismen der Myokardhypertrophie.....</i>	<i>10</i>
2.1.1	<i>Allgemeine Grundlagen</i>	<i>10</i>
2.1.2	<i>Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf das Myokard ...</i>	<i>11</i>
2.2	<i>Grundlagen des Myokardstoffwechsels</i>	<i>13</i>
2.2.1	<i>Substratauswahl unter physiologischen Bedingungen.....</i>	<i>13</i>
2.2.2	<i>Substratauswahl im hypertrophierten Myokard.....</i>	<i>15</i>
2.3	<i>AMP-aktivierte Proteinkinase.....</i>	<i>15</i>
2.3.1	<i>Struktur der AMP-aktivierten Proteinkinase</i>	<i>15</i>
2.3.2	<i>Regulation der AMP-aktivierten Proteinkinase</i>	<i>17</i>
2.3.3	<i>Effekte der AMP-aktivierten Proteinkinase im Myokard</i>	<i>18</i>
2.4	<i>Ziele der Arbeit</i>	<i>19</i>
3	Material.....	20
3.1	<i>Antikörper</i>	<i>20</i>
3.1.1	<i>Primärantikörper</i>	<i>20</i>
3.1.2	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>20</i>
3.2	<i>Real-Time-PCR Primer</i>	<i>20</i>
3.3	<i>Enzyme und Kits</i>	<i>21</i>
3.4	<i>Radioaktiv markierte Substanzen</i>	<i>22</i>
3.5	<i>Geräte.....</i>	<i>22</i>
3.6	<i>Medien, Lösungen, Puffer.....</i>	<i>24</i>

3.7	Verbrauchsmaterialien	26
3.8	Chemikalien und sonstige Reagenzien.....	26
3.9	Auswertungs- und Statistikprogramme	28
4	Methoden	29
4.1	H9C2-Zellkultur.....	29
4.1.1	Kultivierung von H9C2-Zellen	29
4.1.2	Behandlung von H9C2-Zellen.....	30
4.1.3	Ernte und Proteinextraktion von H9C2-Zellen	30
4.2	Neonatale Rattenkardiomyozyten.....	31
4.2.1	Isolation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	31
4.2.2	Ernte und Proteinextraktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten	32
4.3	C57/B16-Mäuse.....	33
4.3.1	Käfighaltung.....	33
4.3.2	Mikrochirurgische Aortenstenosierung.....	33
4.3.3	Invasive Hämodynamikmessung	35
4.3.4	Organentnahme und Proteinextraktion	35
4.4	Spezielle Proteinverarbeitung.....	36
4.4.1	Membran-Cytosol-Auftrennung.....	36
4.4.2	Proteinbestimmung nach Lowry.....	36
4.5	Western Blot Analyse.....	37
4.5.1	Gelelektrophorese	37
4.5.2	Protein-Transfer.....	38
4.5.3	Antikörperinkubation	38
4.6	Radioaktivitätsmethoden.....	39
4.6.1	³ H-Leucin-Inkorporations-Assay	39
4.6.2	³ H-Glukose-Assay und ¹⁴ C -Palmitinsäure-Assay.....	40
4.7	Nilblaufärbung.....	40
4.8	Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	41
4.8.1	RNA-Isolation.....	42
4.8.2	Reverse Transkription.....	42
4.8.3	Real-Time-PCR	42

5	Ergebnisse	44
5.1	<i>Zellkultur</i>	44
5.1.1	Angiotensin II induziert Proteinsynthese, fetales Genprogramm und die Phosphorylierung des Tuberous Sclerosis Complexes-2	44
5.1.2	Angiotensin II steigert den Glukosemetabolismus	46
5.1.3	Angiotensin II führt zu Fettsäureakkumulation, erhöht jedoch nicht die Fettsäureaufnahme	48
5.1.4	Angiotensin II reduziert zeit- und dosisabhängig die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase	50
5.1.5	AICAR inhibiert die durch Angiotensin II induzierte Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase	52
5.1.6	Effekte von AICAR und Präinkubation von AICAR auf den Metabolismus der Kardiomyozyten	54
5.1.7	AICAR verhindert die durch Angiotensin II induzierte Proteinsynthese und die Expression von Hypertrophiemarkern.....	59
5.2	<i>Tierexperimente</i>	61
5.2.1	Kurzzeitige Nachlasterhöhung durch Aortenligatur.....	61
5.2.2	Kurzzeitige Nachlasterhöhung führt zu Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase	63
5.2.3	Kurzzeitige Nachlasterhöhung führt zu Dephosphorylierung der ACC und gesteigerter GLUT4-Membrantranslokation	63
6	Diskussion	65
7	Literaturverzeichnis	70
8	Dank.....	78
9	Lebenslauf und Publikationen	79

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere
Abb	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACE	Angiotensin Converting Enzym
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1-β-D-Ribofuranosid
AK	Adenylatkinase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	atrial natriuretic peptide
AT1-Blocker	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 Blocker
AT1-Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1
AT2-Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 2
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca	circa
CaMKK	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Proteinkinase
CBS	cystathionine beta-synthase
cDNA	complementary DNA
Ci, μCi	Curie, Mikrocurie
CK	Creatinkinase
CPT I	Carnitin-Acyl-Transferase I
Cr	Creatin
Cyt	Cytosol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FABPpm	plasmalemmal fatty acid-binding protein
FAT/CD36	Fettsäuretranslokase
FATP	fatty acid-binding protein
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3`Phosphat-Dehydrogenase
GLUT1	Glukosetransporter Subtyp 1
GLUT4	Glukosetransporter Subtyp 4
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
kg, g, mg, µg	Kilogramm, Gramm, Milligramm, Mikrogramm
Kontr	Kontrolle
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LpL	Lipoproteinlipase
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVPd	minimal diastolischer linksventrikulärer Druck
LVPs	maximal systolischer linksventrikulärer Druck
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MCD	Malonyl-CoA-Decarboxylase
Mem	Membran
β-MHC	β-myosin heavy chain
min	Minute
MLC-2	myosin light chain-2
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2	mammalian Target of Rapamycin Complex 2
MW	Mittelwert
n	Anzahl

n.s.	nicht signifikant
NCS	neonatal calf serum
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCr	Creatinphosphat
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PFK	Phosphofruktokinase
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rheb	Ras-homolog-enriched-in-brain
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Real-Time-Polymerase Chain Reaction
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
TAC	transaortic constriction (Mikrochirurgische Aortenligatur)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TSC-2	Tuberous Sclerosis Complex-2
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
ZDF	zucker diabetic fatty
ZMP	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid-1- β -D-Ribofuranosid-Monophosphat

1 Zusammenfassung

1.1 AMP-aktivierte Proteinkinase inhibiert durch Angiotensin II hervorgerufene metabolische Veränderungen und Hypertrophie von Kardiomyozyten

Angiotensin II (Ang II) ist ein wichtiger Mediator für kardiale Hypertrophie, jedoch sind die Auswirkungen auf den kardiomyozytären Metabolismus nur zum Teil bekannt. In dieser Studie wurde der Einfluss von Angiotensin II auf den Glukose- und Fettsäurestoffwechsel und die Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), ein Schlüsselenzym des Zellmetabolismus und der Zellproliferation, untersucht.

Die Behandlung von H9C2-Kardiomyozyten mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) steigerte die 3 H-Leucin-Inkorporation, die mRNA-Expression der Hypertrophiemarker myosin light chain-2 (MLC-2), atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) und β -myosin heavy chain (β -MHC) und reduzierte die Phosphorylierung des negativen mTOR-Regulators Tuberous Sclerosis Complex-2 (TSC-2). Experimente an neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten ähnliche Ergebnisse. Western Blot Analysen ergaben eine durch Angiotensin II hervorgerufene zeit- und dosisabhängige Erniedrigung des Phosphorylierungszustandes der AMPK, während die Expression der katalytischen α_2 -Untereinheit unverändert blieb. Diese Regulation wurde durch eine gesteigerte Membrantranslokation des Glukosetransporters Subtyp 4 (GLUT4), einer vermehrten 3 H-Glukoseaufnahme und einer Dephosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) bei konstant bleibender Fettsäureaufnahme begleitet. Zur Überprüfung dieser Zellkulturstudien wurden Tierexperimente durchgeführt. Ähnlich wie in den kultivierten Kardiomyozyten führte eine kurzzeitige Nachlasterhöhung durch Aortenligatur an Herzen von Wildtypmäusen trotz Dephosphorylierung der AMPK und der ACC zu einer gesteigerten Membrantranslokation von GLUT4.

Durch Präinkubation der Kardiomyozyten mit dem AMPK-Aktivator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR; 1 mM, 4 h) wurde die durch Angiotensin II induzierte Hypertrophie inhibiert. Zusätzlich verhinderte AICAR die durch Angiotensin II hervorgerufenen metabolischen Veränderungen: Die GLUT4-Membrantranslokation wurde reduziert, während parallel die Phosphorylierungen von ACC und TSC-2 zunahmen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die durch Angiotensin II induzierte kardiale Hypertrophie mit einer verminderten Aktivität der AMPK, einer gesteigerten zellulären Glukoseaufnahme und einer verminderten mTOR-Inhibierung einhergeht. Darüber hinaus zeigen die Experimente, dass die Aktivierung der AMPK mittels AICAR diese metabolischen Veränderungen aufhebt, zu vermehrtem Fettsäuremetabolismus führt und die Entstehung einer kardialen Hypertrophie hemmt.

1.2 AMP-activated proteinkinase reverses metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with Angiotensin II

Angiotensin II (Ang II) induces cardiomyocyte hypertrophy, but its consequences on cardiomyocyte metabolism and energy supply are not completely understood. Here we investigate the effect of Angiotensin II on glucose and fatty acid utilization and the modifying role of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key regulator of metabolism and proliferation.

Treatment of H9C2 cardiomyocytes with Angiotensin II (1 μ M, 4h) increased ³H-leucine-incorporation, upregulated the mRNA expression of the hypertrophy marker genes myosin light chain-2 (MLC-2), atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and β -myosin heavy chain (β -MHC), and decreased the phosphorylation of the negative mTOR-regulator Tuberous Sclerosis Complex-2 (TSC-2). Rat neonatal cardiomyocytes showed similar results. Western blot analysis revealed a time- and concentration- dependent down-regulation of AMPK-phosphorylation in the presence of Angiotensin II while the protein expression of the catalytic α_2 -subunit remained unchanged. This was paralleled by membrane-translocation of glucose-transporter type 4 (GLUT4), increased uptake of ³H-glucose and transient downregulation of phosphorylation of acetyl-CoA-carboxylase (ACC) whereas fatty-acid uptake remained unchanged. Similarly, short-term transaortic constriction in mice resulted in down-regulation of P-AMPK and P-ACC but up-regulation of GLUT4 membrane-translocation in the heart. Pre-incubation of cardiomyocytes with the AMPK-stimulator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR; 1mM, 4h) completely prevented the

Angiotensin II-induced cardiomyocytes hypertrophy. In addition, AICAR reversed the metabolic effects of Angiotensin II: GLUT4-translocation was reduced, but ACC-phosphorylation and TSC-phosphorylation were elevated.

In summary, Angiotensin II-induced hypertrophy of cardiomyocytes is accompanied by decreased activation of AMPK, increased glucose-uptake and decreased mTOR-inhibition. Stimulation with the AMPK-activator AICAR reverses these metabolic changes, increases fatty acid utilization and inhibits cardiomyocyte hypertrophy.

2 Einleitung

2.1 Mechanismen der Myokardhypertrophie

2.1.1 Allgemeine Grundlagen

Die Myokardhypertrophie in Folge linksventrikulärer Druck- oder Volumenbelastung ist ein häufiger Endorganschaden der arteriellen Hypertonie und ist ein wichtiger Prädispositionsfaktor für das Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz. Trotz ihrer klinischen Bedeutung sind die molekulare Pathogenese, die Regulation des myokardialen Energiehaushalts im Rahmen der Myokardhypertrophie sowie die Auswirkung hypertropher Signaltransduktionswege in der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie bislang nur unvollständig verstanden.

Die Hauptmerkmale der Myokardhypertrophie sind die Organvergrößerung durch Vergrößerung der einzelnen Kardiomyozyten, verbunden mit erhöhter Proteinsynthese und Sarkomerdichte. Kurzfristig stellt dies eine Adaptation an die Zunahme der biomechanischen Belastung dar, um eine adäquate Auswurfleistung des Herzens aufrechtzuerhalten. Längerfristig kann sich hieraus jedoch ein maladaptives Remodelling und ein Ungleichgewicht des gesteigerten Energiebedarfs zur Substratverfügung ergeben, wobei diese chronische Form der Hypertrophie, ungeachtet der Ursache, mit signifikanter Zunahme des Plötzlichen Herztodes und Progression der Herzinsuffizienz assoziiert ist ¹⁻³.

Allgemein werden zwei Formen kardialer Hypertrophie unterschieden. Einerseits die druckinduzierte, konzentrische Hypertrophie, die durch Zunahme der ventrikulären Wanddicke ohne Dilatation der Kammer charakterisiert ist und typischerweise auf dem Boden arterieller Hypertonie oder einer Aortenstenose entsteht. Dem gegenüber steht die unter Volumenbelastung entstehende Hypertrophie, die beispielsweise durch insuffiziente Klappen hervorgerufen wird. Diese exzentrische Hypertrophie ist durch eine Dilatation des Ventrikels und durch Zunahme der Wanddicke proportional zum Kammerdurchmesser gekennzeichnet.

In der Frühphase sorgt die Hypertrophie für die Aufrechterhaltung oder Zunahme der kardialen Auswurfleistung und wird als kompensiert verstanden. In der Folge kann es jedoch zu einer Dekompensation kommen, die mit der Abnahme der Ejektionsfraktion einhergeht und in einer Herzinsuffizienz münden kann.

Generell ist die kardiale Hypertrophie neben der Zunahme der Zellgröße, der gesteigerten Proteinbiosynthese und Aberrationen der Genexpression, auch durch Veränderungen des Zellstoffwechsels gekennzeichnet ⁴. Einige dieser Veränderungen, vor allem auf der Ebene der Genexpression, werden ebenfalls bei ventrikulärem Remodelling ⁵ beobachtet und führen zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz ⁶. Längerfristig bedingt die Hypertrophie die Reinduktion des Fetalen Genprogramms. Die hierbei u.a. auftretende Reexpression des atrial natriuretic peptide (ANP) in ventrikulären Kardiomyozyten findet sich bei druck- und volumeninduzierter Hypertrophie ⁷. Reexpressionen anderer Gene des Fetalen Genprogramms, wie das Skelettmuskel spezifische α -actin und β -myosin heavy chain (β -MHC) sind typische Marker für druckinduzierte Hypertrophie ⁷. Die gesteigerte Expression des kardialen α -actin und des ventrikulären myosin light chain-2 (MLC-2) werden sowohl in druckinduzierter als auch in volumeninduzierter Hypertrophie beobachtet. Das ANP verwandte B-Type oder brain natriuretic peptide (BNP), dessen Plasmakonzentration als Verlaufsparemeter der Herzinsuffizienz und –hypertrophie herangezogen wird ⁸, wird generell in hypertrophierten Kardiomyozyten überexprimiert ⁹.

Die Entwicklung der Hypertrophie und deren Assoziation mit kardialer Dekompensation beruht dabei auf einer Fülle intrazellulärer molekularer Veränderungen. Dementsprechend ist die Identifikation der für diese Veränderungen verantwortlichen Signalkaskaden von großer Bedeutung für das Verständnis der kardialen Hypertrophie.

2.1.2 Effekte des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf das Myokard

Neben hämodynamischen Ursachen wie der arteriellen Hypertonie und der Aortenstenose spielen auch nicht-hämodynamisch wirksame Faktoren eine Rolle bei der Entwicklung der Myokardhypertrophie und der in Folge auftretenden Dekompensation. Dafür spricht die Beobachtung, dass die Hypertrophie nicht ausschließlich den linken Ventrikel, sondern auch den muskelschwächeren rechten Ventrikel betrifft. In klinischen Studien mit Patienten, die an arterieller Hypertonie litten, konnte neben linksventrikulärer Hypertrophie auch eine Zunahme der

Wanddicke des rechten Ventrikels festgestellt werden und darüber hinaus eine enge Beziehung zwischen links- und rechtsventrikulärer Hypertrophie beobachtet werden. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Angiotensin II durch seinen direkten Effekt auf das Myokard zu Hypertrophie, Remodelling, Fibrosierung und in der Folge zu einem Funktionsverlust führt ¹⁰⁻¹². Dabei sind die Plasmakonzentrationen von Angiotensin II direkt mit der linksventrikulären Massenzunahme assoziiert ¹³.

Die Signaltransduktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) beginnt zunächst mit der in den Nieren gebildeten Endopeptidase Renin, welche aus dem juxtaglomerulären Apparat freigesetzt wird und im Blut das aus der Leber stammende α_2 -Plasmaglobulin Angiotensinogen durch proteolytische Spaltung in das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) umwandelt. Die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion übernimmt anschließend das Angiotensin Converting Enzym (ACE), das in den Plasmamembranen vor allem von glatten Muskelzellen und Endothelzellen verankert ist. Durch dessen beschleunigte proteolytische Spaltung wird Angiotensin I um zwei weitere Aminosäuren reduziert, womit die biologisch aktive Komponente des Systems, das Oktapeptid Angiotensin II, entsteht. Die Effekte von Angiotensin II werden vornehmlich durch zwei Rezeptoren vermittelt. Die Aktivierung des Angiotensin II Rezeptors Subtyp 1 (AT1-Rezeptor) führt zu einer generellen Wachstumsstimulation verschiedener Zellen des kardiovaskulären Systems. Besonders Kardiomyozyten werden zur Proliferation und zur Expression verschiedener für das Zellwachstum wichtiger Protoonkogene angeregt. Darüber hinaus führt Angiotensin II zu gesteigerter Aldosteronsekretion, welche in der Folge ursächlich für die vermehrte Natrium- und Wasserrückresorption ist. Daneben ist Angiotensin II ein starker Vasokonstriktor und führt zu einem weiteren Anstieg des Blutdrucks. Die durch Angiotensin II induzierte linksventrikuläre Hypertrophie ist allerdings unabhängig von Blutdruck und Natriumhaushalt ¹³. Die Bedeutung der Stimulation des Angiotensin II Rezeptors Subtyp 2 (AT2-Rezeptor) ist bislang unvollständig verstanden – auch wenn angenommen wird, dass Angiotensin II ebenfalls über diesen Rezeptor Einfluss auf das linksventrikuläre Myokard nimmt.

Durch Reduktion der Mortalität bei kardiovaskulären Patienten konnten zahlreiche Studien wie CONSENSUS und SOLVD die Bedeutung der Inhibierung des RAAS belegen ^{14,15}. Lückenhaft sind jedoch die Erkenntnisse über den genauen Mechanismus der Induktion der Myokardhypertrophie. Darüber hinaus ist auch

ungenügend geklärt, welchen Einfluss Angiotensin II auf den Metabolismus des Myokards hat.

2.2 Grundlagen des Myokardstoffwechsels

2.2.1 Substratauswahl unter physiologischen Bedingungen

Die Gewährleistung der Energieversorgung zur Aufrechterhaltung der elektromechanischen Kopplung und der Pumpleistung unter Belastung spielt eine entscheidende Rolle für die Myokardfunktion. Daher ist die rasche Verfügbarkeit von Energie in Form von Creatinphosphat (PCr) und Adenosintriphosphat (ATP) in einem engen Rahmen reguliert. Die Bereitstellung großer Energiemengen kann durch die Aktivität der zwei Enzymsysteme Creatinkinase (CK) und Adenylatkinase (AK) innerhalb von Sekunden aus intrazellulären Speichern erfolgen. Bei einer dauerhaft erhöhten Belastung ist die Regeneration dieser Reserven aus extrazellulären Energielieferanten erforderlich. Das Myokard ist dabei im Stande eine Vielzahl von Substraten zu verstoffwechseln, um seinen immensen Energiebedarf zu decken. Darunter fallen Fettsäuren, Glukose, Laktat, Ketonkörper und Aminosäuren. Je nach Arbeitslast, Substratangebot, Sauerstoffverfügbarkeit und hormonellen Einflüssen ist es jedoch in der Lage, den Anteil der unterschiedlichen Substrate zu regulieren. Unterschieden wird dabei zwischen maladaptiven und adaptiven Hypertrophieformen, bei denen unterschiedliche Stoffwechselwege zur Energiegewinnung bevorzugt werden. Während unter pathologischer Druckbelastung der myokardiale ATP-Bedarf vermehrt durch Glukose gedeckt wird ¹⁶, wird im physiologisch trainingsbelasteten Myokard die Nutzung von Glukose als primären Energielieferanten reduziert ¹⁷. Unklar ist, ob die veränderte Substratverwertung einen sekundären Effekt in Adaptation an die Hypertrophie darstellt, oder ob durch veränderte Substrataufnahme erst die Hypertrophie induziert wird. Darüber hinaus sind die intrazellulären Signaltransduktionswege unzureichend untersucht, die zu Veränderungen des kardiomyozytären Metabolismus führen.

Unter physiologischen Bedingungen wird die intrazelluläre ATP-Produktion des Myokards primär über Fettsäuren, Glukose und Laktat gewährleistet ¹⁸. Zahlreiche Transportproteine und Schlüsselenzyme sind verantwortlich für die Aufnahme des

Substrats und dessen anschließende Verwertung. Während einige dieser Proteine über das Substratangebot oder den momentanen Energiebedarf gesteuert werden, spielen auch kovalente Modifikationen eine entscheidende Rolle.

Physiologischerweise generieren Kardiomyozyten, abhängig von der Konzentration freier Fettsäuren im Plasma, 60-90% ihres aeroben ATPs aus der Oxidation von Fettsäuren ¹⁹. Neben der Fettsäuretranslokase (FAT/CD36), die für mehr als die Hälfte der aufzunehmenden Fettsäuren zuständig ist ²⁰, sind auch das fatty acid-binding protein (FATP) und das plasmalemmal fatty acid-binding protein (FABPpm) für die kardiale Aufnahme von Fettsäuren verantwortlich ²¹.

Ein wichtiger Regulationsmechanismus bei der Oxidation von Fettsäuren stellt die an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Carnitin-Acyl-Transferase I (CPT I) dar. Sie ermöglicht mit aus Lysin gewonnenem Carnitin den Transport von aktivierten Fettsäuren in das Mitochondrium. Dieser aktive Transport ist notwendig, da die Aktivierung der Fettsäuren im Cytoplasma stattfindet, aktivierte Fettsäuren die Lipidmembranen jedoch nicht durchdringen können. Die CPT I wird durch Malonyl-CoA gehemmt, welches durch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), dem Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese, aus Acetyl-CoA hergestellt wird ²².

Neben der β -Oxidation stellt auch die ATP-Produktion aus Glukose einen Energie liefernden Stoffwechselweg im Myokard dar, der 10-40% des gebildeten ATP liefert. Die Aufnahme von Glukose wird durch die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 bewerkstelligt. GLUT1 hat einen Anteil von 30% aller Glukosetransporter in der Plasmamembran und ist primär für die basale Aufnahme von Glukose zuständig. Während die Membrankonzentration von GLUT1 kaum verändert wird, bewirken Insulin oder eine Zunahme der Kontraktilität eine Membrantranslokation vor allem von GLUT4, dem hauptsächlich regulierten Glukosetransporter im Myokard ²³. Glukose wird intrazellulär entweder als Glykogen gespeichert oder als Glukose-6-Phosphat energiebringend verstoffwechselt. Die Glykolyse als initialer Prozess der Glukoseverwertung liefert zunächst zwei ATP pro Mol Glukose und ist auch unter anaeroben Bedingungen energiebringend. Auf diesem Weg entstehen bereits 10% des Gesamt-ATP im gesunden Herzen. Das in der Glykolyse gewonnene Pyruvat kann intramitochondrial weiter durch oxidative Decarboxylierung der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA verarbeitet werden, welches in den Zitratzyklus eingeschleust wird. Unter aeroben Bedingungen liefert ein Mol Glukose

dann 32 Moleküle ATP. Das in der Glykolyse entstehende Pyruvat liefert so den Hauptanteil der aus Kohlenhydraten entstehenden Energie im Myokard.

2.2.2 Substratauswahl im hypertrophierten Myokard

Im Rahmen der Myokardhypertrophie kommt es sowohl durch erhöhte Proteinsynthese als auch durch Substanzvermehrung zu einem gesteigerten Energiebedarf. Wie inzwischen in vielen Untersuchungen bestätigt wurde, wird dieser jedoch nicht proportional aus den zur Verfügung stehenden Substraten gewonnen, sondern es entsteht eine Substratpräferenz. So besteht ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Zunahme der linksventrikulären Hypertrophie und der Abnahme der Oxidation von Fettsäuren²⁴. Gestützt wird diese Beobachtung durch PET-Studien, die eine Abnahme der zellulären Fettsäureaufnahme und eine gleichzeitige Zunahme der Glukoseaufnahme in druckinduzierter kardialer Hypertrophie bei Ratten zeigten²⁵. Weitere Untersuchungen mit Rattenkardiomyozyten, die ursächlich durch Druck- oder Volumenbelastung oder aufgrund von Infarkten hypertrophierten, bestätigten diese Ergebnisse²⁶⁻²⁸. Dabei wurde ein großer Teil der Glukose zu Laktat verstoffwechselt und nicht intramitochondrial oxidiert²⁶. Diese Verschiebung der Substratpräferenz wird dadurch begünstigt, dass Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in ihrer Aktivität bei Druckbelastung gesteigert sind und somit zu einer auf Glukose basierenden Energiegewinnung beitragen²⁹. Dabei ist die Verknüpfung zwischen der Myokardhypertrophie und der Änderung des kardiomyozytären Metabolismus auf intrazellulärer Ebene unzureichend geklärt.

2.3 AMP-aktivierte Proteinkinase

2.3.1 Struktur der AMP-aktivierten Proteinkinase

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein ubiquitär vorkommendes Schlüsselprotein, das regulatorisch in den Energiehaushalt eingreift. Dabei versucht

die AMPK Energiedefizite in der Zelle auszugleichen, indem sie energieverbrauchende Prozesse hemmt und gleichzeitig energiebringende fördert.

Die AMPK ist ein heterotrimeres Protein, das aus drei sich unter den Eukaryonten wenig unterscheidenden Untereinheiten (α , β , γ) aufgebaut ist, deren Isoformen auf unterschiedlichen Genen codiert sind.

Zwei cDNAs wurden für die Codierung der α_1 - und α_2 -Untereinheit in Säugetieren identifiziert ^{30,31}. Der NH²-Terminus trägt eine konventionelle Serin-Threonin-Kinase, dessen Thr-172 hauptsächlich zur Aktivierung der AMPK beiträgt. Darüber hinaus gibt es noch weitere Regionen, die durch Upstream-Kinasen phosphoryliert werden können ³². Das COOH-terminale Ende wird zur Komplexbildung mit den anderen Untereinheiten benötigt. Die α_1 -Untereinheit wird ubiquitär exprimiert, während die α_2 -Untereinheit vornehmlich im Herzen, dem Skelettmuskel und der Leber exprimiert wird ^{30,33}. Im Herzen ist die α_2 -AMPK die dominierende aktive Proteinkinase ^{34,35}.

Für die β -Untereinheit der AMPK konnten ebenfalls zwei cDNAs identifiziert werden. Während die β_1 -Untereinheit ubiquitär exprimiert wird, wird die β_2 -Untereinheit sehr stark im Herzen und Skelettmuskel, jedoch wesentlich schwächer in Lunge und Niere exprimiert ^{36,37}. Die β -Untereinheit dient mit ihrem COOH-terminalen Ende zur Komplexbildung mit den anderen Untereinheiten ^{36,38}.

Es konnten drei Isoformen der γ -Untereinheit aufgezeigt werden, wobei die γ_1 -Untereinheit ubiquitär exprimiert wird und den wesentlichen Anteil der im Herzen vorherrschenden γ -Untereinheiten bildet ³⁴. Alle γ -Untereinheiten enthalten eine Bateman-Domäne mit vier CBS (cystathionine beta-synthase)-Sequenzen ³⁹. Diese Bateman-Domäne dient der Bindung von 5'-AMP bei einem Hill-Koeffizienten von 2,0. Auch ATP kann an die Bateman-Domäne binden und verhindert bei hohen Konzentrationen durch nicht-kompetitiven Antagonismus die Aktivierung durch AMP. Die Bindungsaffinität im Vergleich zu AMP ist jedoch geringer. Mutationen in den CBS-Sequenzen führen zu Glykogenüberladung und sind mit Vorhoffarrhythmien und dem Wolff-Parkinson-White-Syndrom assoziiert ^{40,41}.

Die Existenz verschiedener Isoformen der AMPK-Untereinheiten, codiert durch verschiedene Gene, spricht für die Notwendigkeit einer funktionsfähigen heterotrimeren AMPK. Die Expression mehrerer Untereinheiten dient vorstellbar der Kompensation von Mutationen gleichartiger Untereinheiten oder spricht für spezielle Aufgaben der Untereinheiten in unterschiedlichen Geweben. Die Aufgaben und die

Regulation der im Herzen vorkommenden Isoformen sind dabei bislang mangelhaft erforscht.

2.3.2 Regulation der AMP-aktivierten Proteinkinase

Mehrere Studien haben bereits beschrieben, dass die AMPK durch zellulären metabolischen Stress mit Minderung des ATP-Gehalts aktiviert wird ⁴²⁻⁴⁴. In gesunden Zellen wird eine zehnfach höhere ATP-Konzentration gegenüber der ADP-Konzentration aufrechterhalten. Das Verhältnis von ATP zu AMP ist allerdings ein wesentlich sensiblerer Indikator für den zellulären Energiehaushalt. Trotz geringer Änderungen der ATP-Konzentration unter metabolischem Stress ist der gleichzeitige Anstieg der AMP-Konzentration wesentlich ausgeprägter. Diese Veränderungen regulieren über mehrere Mechanismen die Aktivität der AMPK, die ihrerseits versucht eventuelle Missverhältnisse zu korrigieren ⁴⁵. Ein Mechanismus der Aktivierung der AMPK ist die allosterische Bindung von AMP an die Bateman-Domäne der γ -Untereinheit, die annähernd zu einer fünffachen Zunahme der Kinaseaktivität der α -Untereinheit führt ^{39,46,47}. Zusätzlich führt die Bindung von AMP durch Konformationsänderung zu einer Opsonierung der AMPK für Upstream-Kinasen, was eine Zunahme des Phosphorylierungsgrades an Thr-172 der α -Untereinheit zur Folge hat ⁴⁸. Diese Phosphorylierung überführt die AMPK zu ihrer aktivsten Form. Die Bindung durch AMP hindert ferner Proteinphosphatasen an der Dephosphorylierung und somit an der Inaktivierung der AMPK ⁴⁹. Um die Aktivität der AMPK unter Laborbedingungen steuern zu können, bedient man sich der Substanz 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR). AICAR wird in der Zelle zu 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside-Monophosphat (ZMP) phosphoryliert. ZMP ist es durch seine Strukturähnlichkeit zu AMP möglich an die Bateman-Domäne der γ -Untereinheit zu binden und so die AMPK zu aktivieren. Ferner sind an der Aktivierung der AMPK auch hormonelle Mechanismen beteiligt, die nicht mit Veränderungen des AMP/ATP- bzw. PCr/Cr-Verhältnisses in Verbindung stehen: Leptin ⁵⁰, Adiponectin ⁵¹, Metformin ⁵² und langkettige Fettsäuren ⁵³⁻⁵⁵ führen beispielsweise zu einer Aktivierung der Proteinkinase. Die vermehrte Aktivierung der AMPK durch Phosphorylierung, auch bei physiologischen Konzentrationen langkettiger Fettsäuren ^{53,54}, ist insofern besonders interessant, da der größte Anteil des ATP-Gehalts im Herzen aus der Oxidation von Fettsäuren

resultiert ¹⁹. Dieser Umstand deutet an, dass die AMPK als chemischer Sensor den Verfügungsgrad von Fettsäuren erkennt und diese dem kardialen Metabolismus zuführen kann.

2.3.3 Effekte der AMP-aktivierten Proteinkinase im Myokard

Die Aktivierung der AMPK scheint für das Myokard unter Belastung von Vorteil zu sein, da hierdurch Energie liefernde Prozesse gefördert werden und Energie verbrauchende Abläufe gehemmt werden. Dabei führt die AMPK in experimentellen Systemen unter Ischämie und Reperfusion zu einer vermehrten Aufnahme und Oxidation von Fettsäuren ^{56,57} und zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme ⁵⁸ und Glykolyse ⁵⁹. Über mehrere verschiedene Mechanismen hemmt die AMPK auch die Proteinbiosynthese ⁶⁰⁻⁶³, wodurch vorhandenes ATP eingespart werden kann.

Bei Bedarf an höherer Kontraktilität, was zu einer Erhöhung des AMP/ATP Quotienten führt, induziert die AMPK eine vermehrte Translokation der Fettsäuretranslokase (FAT/CD36) in die Plasmamembran der Kardiomyocyten, womit vermehrt Fettsäuren aufgenommen werden können ⁵⁷. Neben der Aufnahme von Fettsäuren steigert die AMPK unter Ischämie und Reperfusion auch deren Oxidation ^{56,64}. Letzteres führt die AMPK durch Inaktivierung der ACC durch Phosphorylierung herbei ^{56,64-66}. Demgemäß spielt die AMPK eine bedeutende Rolle bei der Fettsäureutilisation des ischämischen Myokards. Die Abhängigkeit des Fettsäurestoffwechsels von der AMPK im hypertrophierten Myokard ist jedoch ungenügend untersucht.

Auch der Einfluss der AMPK auf den Glukosemetabolismus im Herzen ist unzureichend geklärt. Eine Untersuchung zeigte, dass durch Stimulation der AMPK mit AICAR die Glukoseaufnahme durch GLUT4-Membrantranslokation in isolierten ventrikulären Rattenpapillarmuskeln gesteigert wird ⁵⁸. Yang et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass bei Aktivierung der AMPK durch Metformin nur die Endozytose von GLUT4 in Kardiomyozyten inhibiert wird ⁶⁷.

Neben der Stimulation energiegenerierender Stoffwechselwege, hemmt die AMPK energieverbrauchende Prozesse. In älteren Studien wurde bereits erkannt, dass ein intrazellulärer ATP-Abfall eine verminderte Proteinbiosynthese im Herzen zur Folge hat ⁶⁸. Mittlerweile ist erwiesen, dass die AMPK wichtige Schlüsselenzyme der Proteinbiosynthese, wie TSC-2 (Tuberous Sclerosis Complex-2) kontrolliert ⁶³. Durch

Phosphorylierung des TSC-2 durch die AMPK, wird dieser in seiner Aktivität gesteigert ⁶³. TSC-2 ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), welches die GTPase Rheb (Ras-homolog-enriched-in-brain) inhibiert, die die für Zellwachstum und Proteinsynthese wichtige mTOR-Signalkaskade (mammalian Target of Rapamycin) aktiviert ⁶⁹. Über diesen Mechanismus beeinflusst die AMPK mTOR. mTOR ist eine hoch konservierte Serin-Threonin-Kinase und Bestandteil zweier Proteinkomplexe, die unterschiedliche Signalwege von Wachstumsfaktoren, Energiehaushalt und Sauerstoffkonzentration der Zelle kontrollieren, die Translation von Proteinen regulieren und so Zellwachstum und Zellzyklus steuern ^{63,70}. Diese Komplexe sind als mTOR complex 1 (mTORC1) und mTOR Complex 2 (mTORC2) bekannt.

Bei der maladaptiven Myokardhypertrophie, die mit einer gesteigerten Proteinsynthese einhergeht, besteht ein Energiedefizit, welches ein Eingreifen der AMPK auch in die Proteinbiosynthese zur Folge hätte. Bislang ist allerdings unklar, welchen Einfluss die AMPK auf den unter hypertrophen Bedingungen veränderten Metabolismus und die Hypertrophie selbst hat.

2.4 Ziele der Arbeit

Trotz der Bedeutung der AMPK für die zelluläre Regulation des Metabolismus im Myokard ist deren Rolle in der Myokardhypertrophie weitestgehend unerforscht. Angiotensin II ist als ein bedeutsamer Induktor der maladaptiven Myokardhypertrophie bekannt, dessen Einfluss auf den kardiomyozytären Metabolismus und die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen allerdings weitgehend unbekannt sind. Daher sollen in dieser Arbeit folgende Punkte untersucht werden:

1. der Einfluss von Angiotensin II auf den kardiomyozytären Metabolismus
2. der Einfluss von Angiotensin II auf die kardiomyozytäre AMP-aktivierte Proteinkinase
3. die Effekte der AMP-aktivierten Proteinkinase auf den Metabolismus des hypertrophierten Myokards und der Hypertrophie selbst

3 Material

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Produkt	Hersteller
p-ACC (Ser 79) Rabbit IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
AMPK- α_2 (C-20) Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-AMPK- α (Thr 172) Rabbit IgG	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
GLUT4 (C 20) Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
p-tuberin (Thr 1462) Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
GADPH (C6C5) Mouse IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

3.1.2 Sekundärantikörper

Produkt	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Konjugat	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie, München

3.2 Real-Time-PCR Primer

Produkt	Sequenz	Größe	Hersteller
Rat ANP	For: TGG GCT CCT TCT CCA TCA CC Rev: GCC AAA AGG CCA GGA AGA GG	50 bp	MWG, Ebersberg
Rat BNP	For: CAG AAC AAT CCA CGA TGC AG Rev: GCT GTC TCT GAG CCA TTT CC	72 bp	MWG, Ebersberg

Rat β -MHC	For: GCC TAC CTC ATG GGA CTG AA Rev: ACA TTC TGC CCT TTG GTG AC	98 bp	MWG, Ebersberg
Rat MLC:	For: AGG CCT TCA CAA TCA TGG AC Rev: TCG TTT TTC ACG TTC ACT CG	100 bp	MWG, Ebersberg
18 S	For: TTG ATT AAG TCC CTG CCC TTT GT Rev: CGA TCC GAG GGC CTA ACTA	68 bp	MWG, Ebersberg

3.3 Enzyme und Kits

Produkt	Hersteller
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Developer G 153 A	Agfa, Mortsel, Belgien
Developer G 153 B	Agfa, Mortsel, Belgien
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Kollagenase von Clostridium histolyticum	Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA
Omniscript RT Kit 200	Qiagen, Hilden
Pankreatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Platinum SYBR Green qPCR Mix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
Primer Random p(DN)s	Roche, Mannheim
Rapid Fixer G 354	Agfa, Mortsel, Belgien
RNAPure	peqLab Biotechnologie, Erlangen
RNAasin (RNase Inhibitor)	Promega, Madison, WI, USA
Rotiszint Szintillationscocktail	Carl Roth, Karlsruhe

3.4 Radioaktiv markierte Substanzen

Produkt	Spezifische Aktivität	Hersteller
[1- ¹⁴ C]-Palmitic Acid	56 Ci/mmol	GE Healthcare, München
2-Deoxy-D-[2,6- ³ H]-Glucose	51 Ci/mmol	GE Healthcare, München
L-[4,5- ³ H]-Leucine	161 Ci/mmol	GE Healthcare, München

3.5 Geräte

Produkt	Hersteller
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskope:	
Olympus CK 2 Inverted phase contrast	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Nikon SMZ 645	Nikon GmbH, Düsseldorf
mit Schott KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Schott AG, Mainz
Nikon Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Millar-Tip-Katheter SPR-671	Millar Instruments, Houston, Texas USA
mit TF Verstärker	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nagerbeatmungsgerät MiniVent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Spectrophotometer DU 730	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Power Pac 200 Power Supply
Röntgenkassette 24x30cm
Scanner CanoScan D1250 V2F
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040
Schüttelwasserbad Typ 1086
Szintillationcounter Wallac 1400 DAS

Stickstofftank Apollo 50
Stickstoffbehälter GT 140
Ultraschallreiniger Sonorex RK 31 0,9l
Vortexer VV3

Waagen:

VIC-Series 0.01g Precision Balances
ALC-Series 0.0001g Analytical Balances

Überkopfschüttler REAX 2

Zellkulturgeräte:

Heracell 150 Cell Culture Incubator
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12
Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12

Zentrifugen:

Biofuge pico
Kühlzentrifuge 1 K 15
Megafuge 1,0
Ultrazentrifuge L7-55
mit Ultrazentrifugenrotor TFT 70.38

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Canon Deutschland, Krefeld
Heidolph Instruments, Schwabach
Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Wallac Scintillation Products, Wallac, Turku,
Finnland

Messer Griesheim, Krefeld
Air Liquide, Düsseldorf
Bandelin electronics, Berlin
VWR International, Darmstadt

Acculab UK, Edgewood, NY
Acculab UK, Edgewood, NY
Heidolph Instruments, Schwabach

Heraeus Holding, Hanau
Heraeus Holding, Hanau
Heraeus Holding, Hanau

Heidolph Instruments, Schwabach
SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Heraeus Holding, Hanau
Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Kontron, Zürich, Schweiz

3.6 Medien, Lösungen, Puffer

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
ADS Puffer	Aqua dest. 6,78 g/l NaCl 4,76 g/l HEPES 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ 1 g/l Glukose 0,4 g/l KCL 8 ml/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O
Enzym-Mix	ADS Puffer 0,6 mg/l Pankreatin 0,5 mg/l Kollagenase
DMEM-Nährmedium	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) + Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat FKS (10% [v/v]) Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml) Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
DMEM-Hungermedium	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) + Glukose 4,5 g/l; + L-Glutamin; – Pyruvat Penicillin-Streptomycin (20 U/ml Penicillin G; 20 µg/ml) Gentamycinsulfat (0,08 mg/ml)
Elektrophoresepuffer	Ampuwa 144 mg/ml Glycin 30,3 mg/ml Tris 10 mg/ml SDS
F 10 Medium	F 10 Medium (Ham+Glutamin) Horse Serum (10% [v/v]) FKS (5%[v/v]) Penicillin/Streptomycin (1% [v/v])
Ladepuffer	Ampuwa 5 ml 50% Glycerol

	1,25 g 10% SDS 2,5 ml 0,625 M Tris 125 µl/ml 1 M DTT pH 7,6
Lysepuffer	4,8 ml 1 M Tris pH 7,4 2,4 ml 500 mM EDTA 24 ml 100 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 120 ml 200 mM NaF 4,8 ml 100 mM Na ₃ VO ₄ 24 ml NP-40 (10%) 160 µl Aprotinin (10 mg/ml) 160 µl Leupeptin (10 mg/ml) 2,4 ml 100 mM PMSF 57,28 ml H ₂ O
PBS (1x)	Aqua dest. 80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-Tween (1x)	Aqua dest. 80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ 10 ml/l Tween 20 pH 7,4
Ponceau-S-Lösung	0,2% in 3% TCA
5xTransferpuffer	Ampuwa 5,8 mg/ml Tris Base 290 mg/ml Glycin 10 mg/ml SDS

1xTransferpuffer	100 ml 5xTransferpuffer
	300 ml Ampuwa
	100 ml Methanol

3.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Falcon Cell Strainer (70 µm)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
High Performance autoradiography film	GE Healthcare, München
Glasobjektträger	VWR International, Darmstadt
Kyroröhrchen Cyro.S	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Mini-Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark, Koblenz
Pipettenspitzen (5 ml, 25 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
PP-Test-tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Thermanox Plastic Coverslips	Nunc, Rochester, NY, USA
Zellkulturschale (100 mm x 20 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale TC-plate 6-Well	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturschale P6 Primera	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

3.8 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Chemikalien, sonstige Reagenzien	Hersteller
Acrylamid Electrophoresis Purity Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
AICAR	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Angiotensin II	Sigma-Aldrich Chemie, München

Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, München
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, München
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothritol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	VWR International, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
F 10 Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Formalin	VWR International, Darmstadt
Gentamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	VWR International, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ketamin (Ketavet)	Pfizer, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natrium-orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Natrium-pyrophosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Neonatal Calf Serum (NCS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Nilblau (Pulver)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat 10%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ponceau-S-Lösung	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	VWR International, Darmstadt
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Xylazin (Rompun)	Bayer, Leverkusen

3.9 Auswertungs- und Statistikprogramme

Alle Auswertungs- und Statistikprogramme wurden mit dem Betriebssystem Microsoft Windows XP ausgeführt. Dabei dienten Microsoft Excel 2003 und Graph Pad Prism 4.0 der Statistikerhebung und Diagrammgestaltung. Daneben wurden spezielle Programme wie UVP Labworks zur Densitometrie der Western Blot Analysen, VitroTip sowie Amon 32 zur Datenerhebung der invasiven Hämodynamikmessungen und Lucia G Version 4.60 zur Aufnahme und Auswertung der Nilblaufärbung herangezogen.

4 Methoden

4.1 H9C2-Zellkultur

Die verwendete kardiomyozytäre Zelllinie H9C2 (LGC Promochem, Wesel) wurde 1976 von Kimes und Brandt durch selective serial passaging nach Yaffe et al. aus embryonalem Ventrikelmyokardgewebe einer BDIX Ratte isoliert⁷¹⁻⁷³. Aufgrund der Expression nikotinerger Acetylcholinrezeptoren und der Synthetisierung einer muskelspezifischen Creatinphosphokinase in den Konglomeraten, wurde von den Forschern damals angenommen, die Zellen hätten sich zu Skelettmuskelzellen differenziert. Erneute Untersuchungen der H9C2-Zellen von Hescheler et al. 1991 hingegen konnten u.a. Ionenkanäle nachweisen, die alle Charakteristika kardialer L-Typ-Calciumkanäle aufwiesen. Gleichzeitig bestätigten sie eine der kardialen Zellmembran und -oberfläche sehr ähnliche Struktur, konnten jedoch keine eindeutigen gemeinsamen morphologischen Eigenschaften nachweisen⁷⁴. Trotz aller Kontroversen haben sich H9C2-Zellen in der kardiologischen Forschung als Standardzellmodell durchgesetzt, da sie zuverlässig kultivierbar und in ihrem Expressionsprofil und den Signaltransduktionswegen mit der biochemischen Antwort frisch extrahierter neonataler Rattenkardiomyozyten vergleichbar sind.

4.1.1 Kultivierung von H9C2-Zellen

Die in Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und im Anschluss in eine mit DMEM-Nährmedium vorbereitete Zellkulturschale (100 mm x 20 mm) gegeben. Die Zellen wurden in einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil bei 37°C in Gewebekulturschalen mit 100% Sättigung der Luft mit H₂O in Kultur gebracht. Um DMSO-Reste zu entfernen, wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt. Weitere Medienwechsel wurden alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wuchsen, bis sie einen subkonfluenten Zellrasen bildeten.

Zur Passage wurde das Medium abgesaugt, die Schalen mit je 5 ml 1xPBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Die nun gelösten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen DMEM-Nährmedium

aufgenommen und im Verhältnis 1:1 ausgedünnt, um die Aktivität des Trypsins zu inhibieren. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1.000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellzentrifugat in DMEM-Nährmedium resuspendiert und neu ausgesät. Dabei wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 auf neue Schalen verteilt.

Die Zellen wurden vor dem Einfrieren analog behandelt, jedoch wurden hier die Zellen nach dem Abzentrifugieren in DMEM-Nährmedium mit 5% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in ein eisgekühltes Kryoröhrchen aliquotiert. Um die Zellen nicht durch Kristallbildung zu gefährden, wurde eine Temperaturabnahme von 1°C pro Minute in einem Kryoeinfriergerät gesichert. Am nächsten Tag wurden die Zellen langfristig in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

4.1.2 Behandlung von H9C2-Zellen

Nachdem die Zellen durch Kultivierung einen ca. 80%igen konfluenten Zellrasen ausgebildet hatten, wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen. Für einen Zeitraum von 12-24 Stunden wurden die Zellen in DMEM-Hungermedium inkubiert und anschließend, wenn nicht anders beschrieben, in DMEM-Hungermedium behandelt. Angaben zu Dosis und Zeit der Stimulation werden an entsprechender Stelle gemacht.

4.1.3 Ernte und Proteinextraktion von H9C2-Zellen

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium in den Kulturschalen unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Schalen zweimal mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen. Um das Gesamtprotein der Zellen zu isolieren, wurden je nach Größe der verwendeten Kulturschale mit Hilfe 0,2-2 ml gekühlten Lysepuffers die Zellen von den Schalen gelöst und in ein Eppendorfgefäß übertragen. In einem fünfminütigen Ultraschallbad wurde das Aufbrechen der Zellmembranen gewährleistet. Um die Zellorganellen aus dem Lysat zu entfernen, wurde eine Zentrifugation mit 14.000 U/min für 15 Minuten bei 4°C durchgeführt. Danach wurde der Überstand abpipettiert, bei -20°C eingefroren und das Zentrifugat verworfen.

4.2 Neonatale Rattenkardiomyozyten

Um Kontroversen über wissenschaftliche Ergebnisse in H9C2-Zellen entgegenzutreten, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. med. H. Kilter zur Verfügung gestellt worden waren. Da sich Isolation und Kultivierung dieser Zellen wesentlich aufwendiger gestalten und die Zellen nicht vermehrungsfähig sind, wurden in diesem Modell nur ausgewählte Experimente durchgeführt, um die wesentlichen Erkenntnisse zu verifizieren.

4.2.1 Isolation und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die Isolation begann mit der Dekaptierung von neonatalen Wistar Ratten am Tag zwei post partum mittels einer Schere, wobei der Kopf verworfen und der Körper kurz in 70% Ethanol gespült wurde. Durch vorsichtige Massage des Thorax erschien das Herz in der oberen Thoraxapertur, dessen Gefäßverbindungen durchschnitten wurden und das Organ schließlich in einer zuvor mit ADS Puffer bereiteten Zellkulturschale (100 mm x 20 mm) aufgefangen wurde. Durch weitere Präparation wurden weiteres perikardiales Gewebe, Gefäßstümpfe und die Vorhöfe entfernt. Das somit erhaltene Ventrikelpräparat wurde in eine mit frischem ADS-Puffer gefüllte Zellkulturschale gegeben und in ca. 15 gleich große Stücke geteilt. Der ADS-Puffer wurde nun abpipettiert und die Gewebssuspension in 10 ml Enzym-Mix unter mehrmaliger Resuspendierung in eine sterile Flasche überführt. In dieser wurde das Gewebslysate nun fünf Minuten in einem Schüttelwasserbad mit 80-100 U/min bei 37°C inkubiert. Der sich hierbei bildende Überstand (Verdau) wurde ohne Mitnahme von Gewebsstücken mittels einer Pipette entfernt und verworfen. Erneut wurden 10 ml Enzym-Mix hinzugegeben und die Suspension für 20 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand in ein steriles 50 ml Test-tube-Gefäß gegeben, die Aktivität der Enzyme mit 2 ml Neonatal Calf Serum (NCS) gestoppt und bei 700 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde nach Entfernung des Überstandes durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml zugesetztem NCS gelöst. Diese Prozedur wurde noch weitere fünfmal

durchgeführt, wobei sich die Schüttelzeiten wie folgt gestalteten: 25 min; 25 min; 15 min; 10 min; 10 min; 5 min. Nach der letzten Zentrifugation (700 U/min, fünf Minuten) wurde der Überstand verworfen und das Zellzentrifugat in 4 ml F 10 Medium durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein Falcon Cell Strainer (70 µm) filtriert, wobei vor und nach der Filtration der Filter mit je 1 ml F 10 Medium gespült wurde. Diese 6 ml Zellsuspension wurde nun auf 6-cm-Zellkulturschalen ausgesät und für 60 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre inkubiert, wobei mikroskopisch die Adhäsion der Fibroblasten am Schalenboden kontrolliert wurde. Sobald sich die Fibroblasten gebunden hatten, wurde das Medium mit den darin enthaltenen Kardiomyozyten abpipettiert, in ein 50 ml Test-tube-Gefäß gegeben und die Zellzählung durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan blue in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier große Eckquadrate (Volumen je Eckquadrat: 0,1 µl) ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus $2 \times \text{MW} \times 10^4 \times \text{Volumen}$ der Zellsuspension. Aufgrund der Berechnung wurde die Zellsuspension auf das gewünschte Volumen durch Zugabe von F 10 Medium gebracht und in jeweils 4 ml Medium mit $1,6\text{-}1,8 \times 10^6$ Zellen je P6 Primera Zellkulturschale ausgesät. Die Zellkulturschalen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre für 48 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen, für weitere 16 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und danach stimuliert. Weitere Angaben zur Dosis und Stimulationszeit werden an entsprechender Stelle gemacht.

4.2.2 Ernte und Proteinextraktion von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen und mit 200 µl Lysepuffer geerntet. Das Zelllysate wurde sieben Minuten in einen Ultraschallreiniger gegeben, um die Zellmembranen aufzubrechen, und danach bei 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

4.3 C57/B16-Mäuse

4.3.1 Käfighaltung

Die verwendeten C57/B16-Wildtypmäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) wurden im Institut für experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes unter Standardbedingungen gehalten. Die Tierversuchsgenehmigung wurde durch das Veterinäramt und die Kreispolizeibehörde des Saar-Pfalz-Kreises erteilt.

4.3.2 Mikrochirurgische Aortenstenosierung

Um eine Druckbelastung für das Myokard zu erzeugen, wurde durch eine mikrochirurgische Stenosierung das Lumen der Aorta ascendens eingeengt. Die Kontrolltiere wurden lediglich einer Thorakotomie mit Freilegung und Umschlingung der Aorta unterzogen (Scheinoperation).

Die Operation wurde bei zehn Wochen alten Mäusen durchgeführt. Der vergrößerte Strömungswiderstand führte zu einer akuten Zunahme der Nachlast.

Die Tiere wurden mit der Hellabrunner Mischung aus 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin in NaCl 0,9% verdünnt narkotisiert. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Die Dauer der Narkose betrug bei der angegebenen Dosierung etwa 45 Minuten. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Versuchstiere endotracheal mit einem 20 G Venenverweilkatheter intubiert (Abb. 1A) und durch das Nagerbeatmungsgerät mit Raumluft beatmet. Das Atemzeitvolumen betrug 200 ml/min, die Beatmungsfrequenz 110/min. Nach Fixierung der Tiere auf einem Heizkissen und nach Rasur des Thorax erfolgte ein ca. 0,5 cm langer Hautschnitt links parasternal von der zweiten bis zur vierten Rippe. Die Musculi pectorales major und minor wurden mit einer Schere durchtrennt, so dass man die Rippen und die Interkostalmuskulatur sah. Des Weiteren wurde die dritte und vierte Rippe mit einem Schnitt durchtrennt und die Interkostalmuskulatur parallel zum Sternum zur zweiten und fünften Rippe hin durchtrennt. Zu diesem Zeitpunkt wurde zunächst zur invasiven Hämodynamiküberwachung der Millar-Tip-Katheter (genaue Durchführung siehe 4.3.3) in den linken Ventrikel eingeführt und dort bis zur Tötung der Tiere belassen. Nach Eröffnung der Pleurahöhle wurde die

Thoraxöffnung gespreizt und der Thymus mit einer Pinzette entfernt. Das Perikard wurde eröffnet und die Aorta ascendens aus ihrem Gefäßbett mobilisiert, so dass man sie mit einer gebogenen, fadenführenden 24 G Nadel (Abb. 1B) aufnehmen konnte. Die 24 G Nadel wurde unter Belassen des 6-0 Nylonfadens unter der Aorta entfernt. Als Widerlager bei der Verknotung wurde eine ebenfalls gebogene 27 G Nadel verwendet (Abb. 1C). Damit wurde eine gleichmäßige Einengung der Aorta innerhalb der Versuchsgruppe auf einen Diameter von 360 μm erreicht. Dies entspricht einer transversen Aortenstenosierung von 65-70% (Abb. 1D). Nach Stenosierung der Aorta ascendens blieben die Tiere für weitere 30 Minuten intubiert, um einer Ischämie des Myokards aufgrund der akut erhöhten Nachlast entgegenzuwirken.

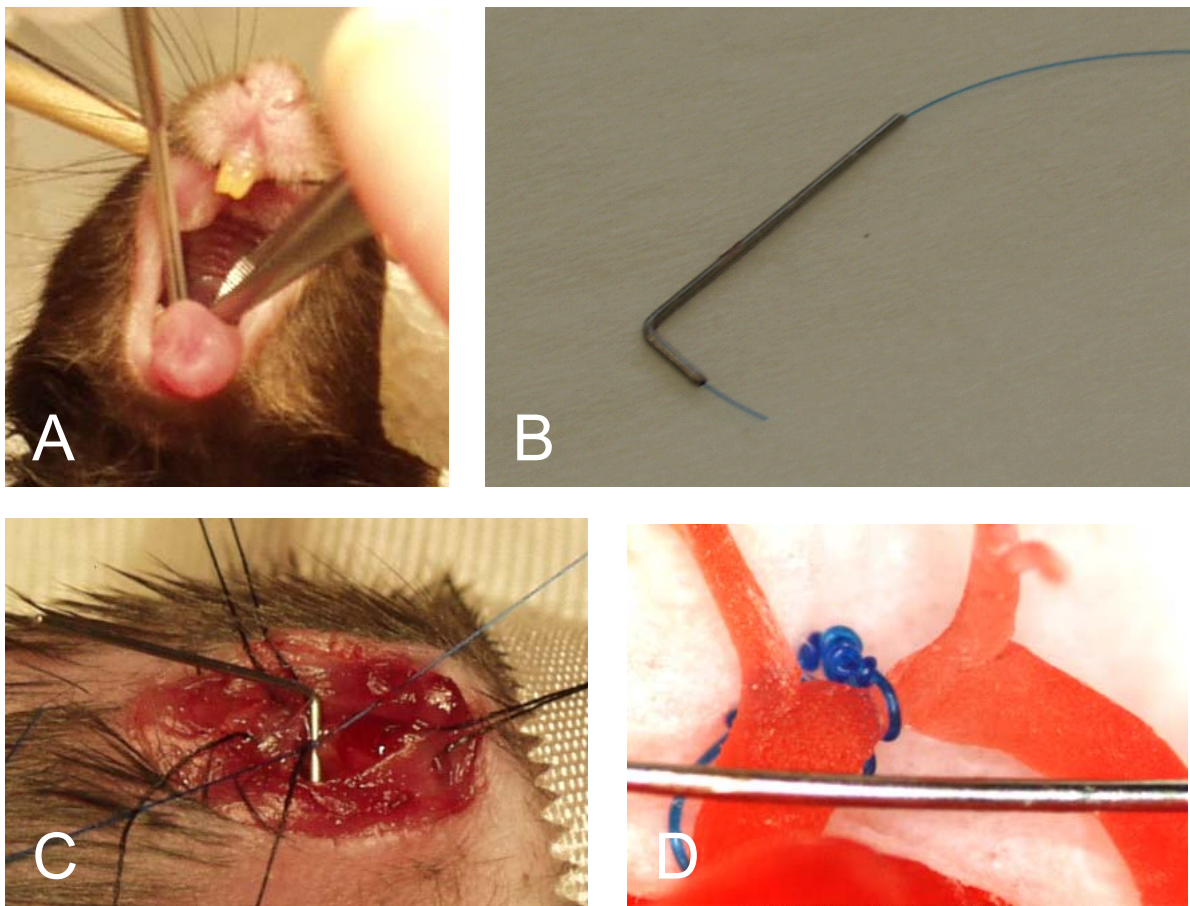


Abb. 1: **A** Intubation der Maus mittels 20 G Venenverweilkanüle **B** 24 G Nadel mit 6-0 Faden zur Aortenstenosierung **C** Stenosierung der Aorta bei Verwendung einer 27 G Nadel als Widerlager **D** Präparat einer stenosierten Aorta.

4.3.3 Invasive Hämodynamikmessung

Zur invasiven Hämodynamikmessung wurden die Tiere wie in 4.3.2 mit Ketamin und Xylazin narkotisiert und in der Folge endotracheal intubiert. Nach Fixierung auf einem Heizkissen wurde die Haut der linken Thoraxhälfte parasternal eröffnet. Weiterhin wurden thorakale Muskeln durchtrennt und von der zweiten bis fünften Rippe durch einen Schnitt die Sicht auf den schlagenden linken Ventrikel freigelegt. Dabei wurde darauf geachtet, den Blutverlust so gering wie möglich zu halten, um einer hypovolämen Kreislauftsituation vorzubeugen. Der Apex des linken Ventrikels wurde zunächst mit einer 24 G Nadel punktiert, um anschließend den 1,4 Fr Millar-Tip-Katheter in den linken Ventrikel einzuführen. Über diesen Millar-Tip-Katheter wurden vor der Stenosierung der Aorta bis zu Tötung der Tiere der maximale systolische und der minimale diastolische linksventrikuläre Druck (LVPs, LVPd), der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP), die Druckänderung dP_{max}/dt und dP_{min}/dt und die Herzfrequenz gemessen. Das System bestand aus dem Katheter und einem TF Messverstärker, der mit einem PC verbunden war.

4.3.4 Organentnahme und Proteinextraktion

Die Tötung der Tiere erfolgte bei bestehender Narkose und Intubation durch Herausnahme des Herzens. Das Herz wurde umgehend in einem Eppendorfgeläß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und weiter bei -80°C gelagert. Zur Analyse wurde von dem stets gefrorenen Material ein minimales Stück durch ein Skalpell abgetrennt. Um aus den Gewebstücken das Gesamtprotein zu isolieren, wurden diese zunächst in 500 – 800 μl eisgekühlten Lysepuffer gegeben und mit Hilfe eines Mörsers manuell zu groben Stücken reduziert. In einem Überkopfschüttler wurde das Lysat anschließend bei 4°C für eine Stunde inkubiert, um eine feinere Zerkleinerung zu erreichen. Um die Zellorganellen aus dem Lysat zu entfernen, wurde danach eine Zentrifugation mit 14.000 U/min für 15 Minuten bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde abpipettiert, bei -20°C eingefroren und das Zentrifugat verworfen.

4.4 Spezielle Proteinverarbeitung

4.4.1 Membran-Cytosol-Auftrennung

Um die Zellmembran aus dem Gesamtprotein zu isolieren, wurde zunächst, wie oben beschrieben, eine Proteinextraktion durchgeführt, wobei das Lysat in gekühlte Ultrazentrifugenröhrchen übertragen wurde. Das Lysat wurde 1:1 mit 1 mM KCl versetzt und 10 Minuten eisgekühlt inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 45.000 U/min für zwei Stunden ultrazentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, das Zentrifugat mit 200 µl Lysepuffer resuspendiert und beides bei -20°C eingefroren. Dabei entsprechen der Überstand dem Cytosol und das Zentrifugat den Zellmembranen.

4.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung des Gesamtlysats aus Zellkulturen und Gewebstücken erfolgte nach der Methode von Lowry et al., eine der Biuret-Methode verwandten, kalorimetrischen Methode ⁷⁵.

Zunächst wurde 1 µl des zu untersuchenden Proteinlysats 1:20 mit Ampuwa verdünnt. Durch Zugabe von 100 µl D_C Protein Assay Reagent A wurde ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex wurde anschließend durch 800 µl zugegebenes Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagens (D_C Protein Assay Reagent B) reduziert. Während der Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur färbte sich die Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bläulich. Die Extinktion der Lösung wurde bei 540 nm photometrisch gemessen, um dann die daraus resultierende Proteinkonzentration zu berechnen. Als Standardproteinlösung diente Rinderserumalbumin in einem Konzentrationsbereich von 100–1.000 µg/ml.

4.5 Western Blot Analyse

Mit der Western Blot Analyse ist es möglich, Proteine der Zellen aus Kultur oder aus einem Gewebstück aufzutrennen. Durch monoklonale Antikörper gegen ein spezifisches Protein und durch Peroxidase- oder Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper werden diese sichtbar und quantifizierbar gemacht. Dabei ist die Intensität proportional zum Gehalt des jeweiligen Proteins im Lysat.

4.5.1 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels Gelelektrophorese in denaturierenden 10%igen Polyacrylamid-SDS-Gelen (Tabelle 1). Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel wurde zuerst in eine Minigelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine scharfe Gelfront zu erhalten. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgeschüttet, das Sammelgel gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Es wurden jeweils 50 µg Protein des Gesamtllysats mit entsprechender Menge 5xLadepuffer versetzt. Dabei ist der Zusatz des Redoxmittels DTT für das Aufbrechen der für die Tertiärstruktur wichtigen Disulfidbrücken notwendig. Um ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis herzustellen, wurden die Proteine mit dem ebenfalls im Ladepuffer enthaltenem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) belegt, um die native Ladung, d.h. die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte verschiedener Proteinspezies zu überdecken. Die nun linearisierten Proteine wurden auf das Gel geladen und in Anwesenheit eines Elektrophoresepuffers bei einer konstanten Spannung von 120 V aufgetrennt.

Tabelle 1: Zusammensetzung eines verwendeten Polyacrylamid-SDS-Gels

Substanz	Trenngel 10%	Sammelgel
Ampuwa	3,7 ml	1,7 ml
30% Acrylamid	3,4 ml	0,415 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	—
1,0M Tris (pH6,8)	—	0,315 ml
10% SDS	0,1 ml	0,025 ml
10% APS	0,1 ml	0,025 ml
TEMED	0,004 ml	0,0025 ml

4.5.2 Protein-Transfer

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mit dem Mini Trans-Blot System von Biorad, mit Hilfe eines Transferpuffers und Filtern bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA. Die Membran wurde mit der gebrauchsfertigen kolloidalen Farbstoff enthaltenden Ponceau-S-Lösung nach dem Transfer überschichtet und ca. fünf Minuten lang unter leichtem Schütteln gefärbt. Der Hintergrund wurde mit destilliertem Wasser entfärbt bis die Proteinbanden klar sichtbar waren. Um die Membran zu blocken, wurde sie nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser in 5%iger Milch für eine Stunde bei 4°C auf einem Schüttel- und Mischgerät inkubiert.

4.5.3 Antikörperinkubation

Die Nitrozellulose-Membranen wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper (Verdünnung 1:1.000) in 1%iger Milch für zwölf Stunden bei 4°C auf einem Schüttel- und Mischgerät inkubiert. Die nichtgebundenen Antikörperfragmente wurden mit 1xPBS-Tween zweimal über fünf Minuten und einmal mit 1xPBS abgewaschen. Danach wurden die Membranen 90 Minuten mit einem peroxidasekonjugiertem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1.000) in 5%iger Milch bei Raumtemperatur

ebenfalls auf einem Schüttel- und Mischgerät inkubiert. Die ungebundenen Fragmente wurden erneut mit 1xPBS-Tween und 1xPBS abgewaschen. Die an die Proteinbanden gebundenen Fragmente wurden mit einem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence) auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und densitometrisch quantifiziert.

4.6 Radioaktivitätsmethoden

Mittels radioaktiv markierter Substanzen ist es möglich, die zelluläre Aufnahme einer Substanz bei unterschiedlichen Bedingungen zu bestimmen. Der markierte Stoff wird von den Zellen entweder durch Diffusion oder Transporter in das Cytosol aufgenommen und in der Folge gespeichert oder metabolisiert. In allen Fällen verbleibt das Isotop ebenfalls in den Zellen, deren abgegebene Strahlung detektierbar ist und eine quantitative Aussage über die Aufnahme der zuvor angebotenen radioaktiv markierten Substanz macht.

4.6.1 ^3H -Leucin-Inkorporations-Assay

Ein Marker für die Proteinbiosynthese ist die Aufnahme von ^3H -markiertem Leucin, da es sich bei Leucin um eine proteinogene Aminosäure handelt.

Für die Durchführung des Assays wurden zunächst konfluente H9C2-Zellen in 6-Well-Zellkulturschalen für 24 Stunden in Hungermedium inkubiert. Danach wurde das Hungermedium abgesaugt, die Zellen mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen und in Nährmedium mit 1 μM Angiotensin II für sechs Stunden oder mit 1 M AICAR für zwei Stunden stimuliert. Zur Präinkubation wurde zunächst mit 1 M AICAR vier Stunden stimuliert und danach für weitere sechs Stunden 1 μM Angiotensin II hinzugegeben. Anschließend wurden 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Leucin zugefügt, d.h. bei 2 ml Nährmedium 2 μl Leucin, und die Zellen für weitere sechs Stunden inkubiert. Nachdem das Medium abgesaugt und die Zellen fünfmal mit 1xPBS gewaschen worden waren, wurden mit Hilfe von 500 μl Lysepuffer die Zellen aus den Wells gelöst und jeweils in ein Szintillationsröhrchen überführt. Dem Lysat wurden 750 μl

Szintillationscocktail zugeführt. Danach erfolgte die direkte Messung der Emissionen in einem Szintillationscounter.

4.6.2 ^3H -Glukose-Assay und ^{14}C -Palmitinsäure-Assay

Glukose und Fettsäuren sind wichtige Nährstoffe für Zellen. Es ist dabei von der Stoffwechsellage abhängig, welche der beiden Substanzen bevorzugt zur Energiegewinnung verwendet wird. Durch radioaktive Markierung dieser Substanzen kann quantitativ deren Aufnahme in die Zelle gemessen werden.

Zunächst wurden H9C2-Zellen auf 6-Well-Zellkulturschalen passagiert und 24 Stunden in DMEM-Hungermedium bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen. In 2 ml autoklaviertem 1xPBS wurden die Zellen in der Folge stimuliert. Dabei wurden die Zellen für zehn Minuten jeweils mit 1 µM Angiotensin II in 1xPBS, für zehn Minuten mit 1 mM AICAR in 1xPBS oder für zehn Minuten mit 1 mM AICAR in 1xPBS präinkubiert und danach mit 1 µM Angiotensin II in 1xPBS für zehn Minuten bei 37°C und 5% CO₂ in einer feuchten Atmosphäre inkubiert. Im Anschluss wurden 0,1 µCi/Well 2-Deoxy-D-[2,6- ^3H]-Glukose oder 1 µCi/Well [1- ^{14}C]-Palmitinsäure zugegeben und für 30 Minuten ebenfalls bei oben genannten Angaben inkubiert. Nach den Inkubationszeiten wurde das PBS, in dem Stimulanzien und 2-Deoxy-D-[2,6- ^3H]-Glukose bzw. [1- ^{14}C]-Palmitinsäure gelöst waren, abgesaugt und mit frischem PBS dreimal vorsichtig gewaschen. Mit Hilfe von 200 µl Lysepuffer wurden die Zellen aus den Wells gelöst und jeweils in ein Szintillationsröhrchen überführt. Dem Lysat wurden 750 µl Szintillationscocktail zugeführt. Danach erfolgte die direkte Messung der Emissionen in einem Szintillationscounter.

4.7 Nilblaufärbung

Um den Fettsäuregehalt der H9C2-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten auf Kulturplättchen (Coverslips) ausgesät und wie folgt behandelt: Angiotensin II mit einer Konzentration von 1 µM über vier Stunden, AICAR

mit einer Konzentration von 1 mM über zwei Stunden. Im Fall der Präinkubation erfolgte die AICAR-Vorbehandlung über zwei Stunden mit einer Konzentration von 1 mM, gefolgt von Angiotensin II über vier Stunden mit einer Konzentration von 1 μ M. Die Zellen wurden zweimal mit 500 μ l eisgekühltem PBS gewaschen und anschließend in Formalin fixiert. Die Plättchen wurden in einer 7%igen wässrigen Nilblau-Lösung für zehn Minuten bei 60°C inkubiert, dann die überschüssige Farbe mit Wasser abgewaschen, gefolgt von einer zehnminütigen Waschung mit 1%iger Essigsäure zur Einstellung des pH-Wertes. Die Plättchen wurden danach erneut mit Wasser abgespült, getrocknet und unter einem optischen Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung photographiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels digitaler Bildanalyse mit dem Auswertungsprogramm Lucia G Version 4.60.

4.8 Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus ("Real Time") durchgeführt. Dazu wird die zuvor isolierte RNA, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, in die komplementäre DNA umgeschrieben. Die entstandene DNA wird in der Polymerasekettenreaktion durch Erhitzen getrennt und mit spezifischen Oligonucleotiden, die als Primer im Überschuss in einer Polymerasesynthesereaktion eingesetzt werden, hybridisiert. Das RNA/DNA-Fragment von Interesse fungiert hierbei als Matrize für die Primer. Durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Reaktion wiederholt sich dieser Vorgang und produziert exponentiell neue DNA-Fragmente. Zusätzlich bedient man sich Farbstoffen, die mit der DNA interkalieren und über Fluoreszenzmessung detektierbar sind. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht.

4.8.1 RNA-Isolation

Um die mRNA-Expression messen zu können, wurde die Gesamt-RNA aus Zellen isoliert. Hierzu wurden kultivierte Zellen von den Kulturschalen mittels einer RNA-Isolutionslösung (RNA-Clean) isoliert. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation mit 14.000 U/min wurden die Proteine abgetrennt. Die RNA wurde durch Isopropanolpräzipitation (15 Minuten, 4°C) konzentriert und dann 60 Minuten bei 4°C mit 14.000 U/min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 75%igem Ethanol durch Vortexen und Zentrifugation (15 Minuten, 14.000 U/min, 4°C) gewaschen. Die Quantifizierung der Gesamt-RNA erfolgte in einem Spectrophotometer mittels UV-Licht, bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Der Quotient 260/280 nm ergibt Hinweise auf den Reinheitsgrad der isolierten RNA. Er sollte bei 1,8-2,0 liegen, da die 260 nm Wellenlänge den RNA- oder DNA-Gehalt misst, während das 280 nm Licht insbesondere von kontaminierten Proteinen absorbiert wird.

4.8.2 Reverse Transkription

2 µg der isolierten und quantifizierten mRNA wurden mit DEPC-Wasser auf insgesamt 10 µl Volumen gebracht. Nach Zugabe von 2 µl Buffer RT, 2 µl dNTP Mix, 2 µl Primer Random, 1 µl RNAsin (10 U/µl) und 1 µl Omniscript RT wurde das Gemisch bei 37°C für eine Stunde in einem Wasserbad inkubiert. Hierbei findet die reverse Transkription von RNA in cDNA statt. Um die Transkription zu beenden, wurde das Gemisch anschließend auf einem Metallblockthermostat für fünf Minuten auf 93°C erhitzt. Hierbei verliert die reverse Transkriptase ihre Aktivität. Zur Lagerung wurde das somit erhaltene RT-Produkt bei -20°C eingefroren.

4.8.3 Real-Time-PCR

Die RT-PCR wurde mit dem TaqMan System durchgeführt. Für die Marker des fetalen Genprogramms und des Housekeeping Gens 18S wurden spezifische Primer eingesetzt. Pro Bedingung wurden 12,5 µl Puffer (SYBR Green), je 1 µl (5 µM) der

Primer sowie 1 µl des RT-Produkts (cDNA), je 0,5 µl des Referenzfarbstoffes (Rox) und 7 µl Wasser eingesetzt. Es wurden 40 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 95°C und 15 Sekunden bei 60°C durchgeführt. Bei der Quantifizierung wurden die mRNA Expressionen der Hypertrophiemarker des fetalen Genprogramms auf die Expression des Housekeeping Gens 18S bezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Zellkultur

5.1.1 Angiotensin II induziert Proteinsynthese, fetales Genprogramm und die Phosphorylierung des Tuberous Sclerosis Complexes-2

Zelluläre Hypertrophie ist durch eine Steigerung der Proteinsynthese bedingt. Angiotensin II induzierte die Proteinbiosynthese in Kardiomyozyten. Dies haben wir anhand der Inkorporation der proteinogenen Aminosäure L-[4,5-³H]-Leucin quantifiziert. Die Inkubation der H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 μ M, 6 h) ergab eine Zunahme der ³H-Leucin-Inkorporation auf $163 \pm 12\%$ (n=4, p<0,001) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 2).

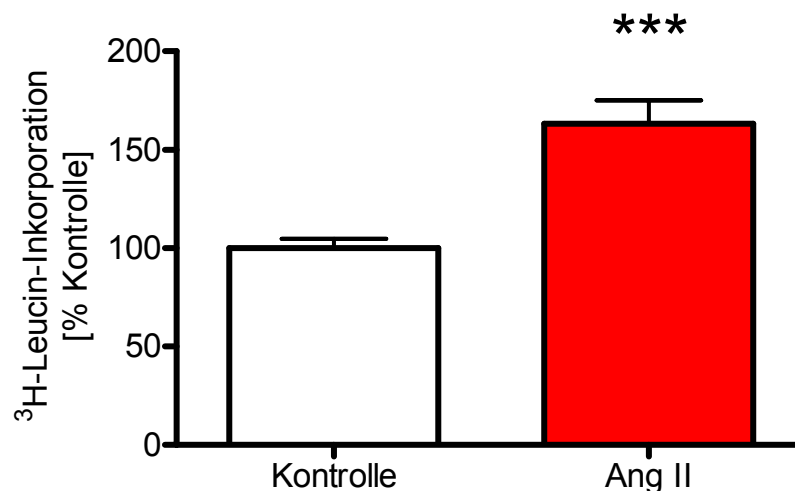


Abb. 2: Effekt von Angiotensin II auf ³H-Leucin-Inkorporation in H9C2-Zellen. Inkubation von H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 μ M, 6 h) steigerte signifikant die ³H-Leucin-Inkorporation (n=4). ***p<0,001.

In der RT-PCR zeigte sich bei gleicher Behandlung der Zellen eine Zunahme der Expression der myosin light chain-2 (MLC-2) auf $176 \pm 26\%$ (n=5, p<0,01), des atrial natriuretic peptide (ANP) auf $189 \pm 25\%$ (n=5, p<0,01), des brain natriuretic peptide (BNP) auf $166 \pm 27\%$ (n=4, p<0,01) und der β -myosin heavy chain (β -MHC) auf

171±28% (n=4, p<0,01) (Abb. 3). Bei der Quantifizierung wurden die Ergebnisse auf das Housekeeping Gen GAPDH standardisiert.

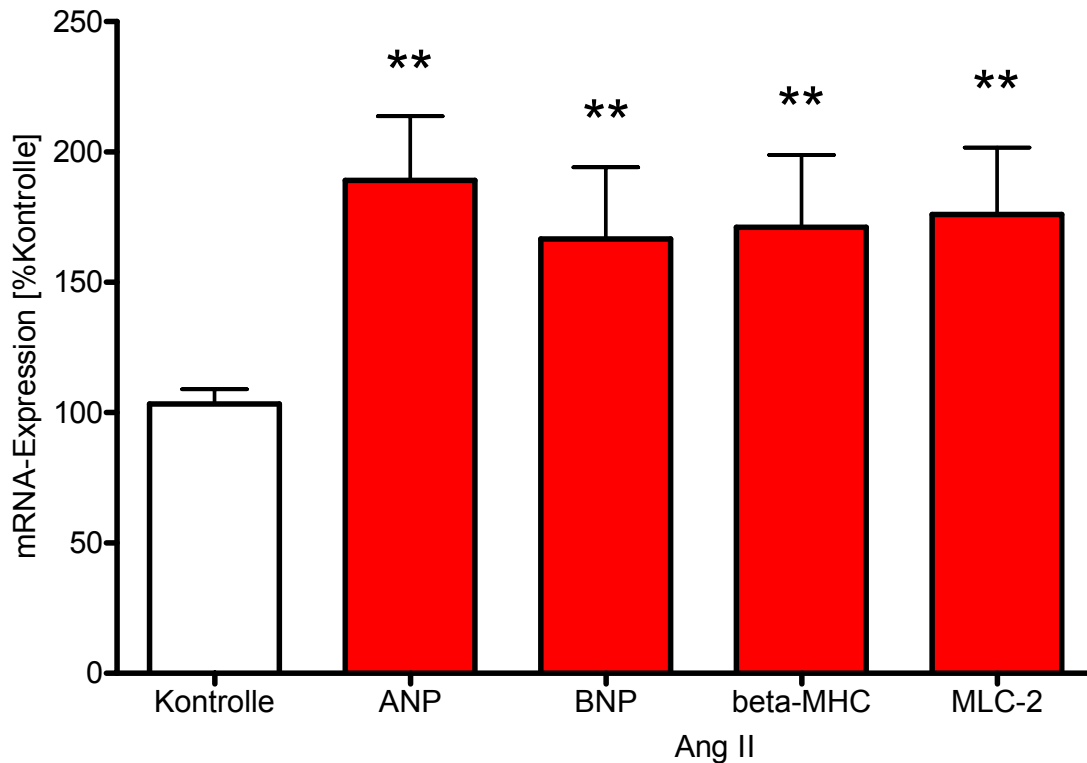


Abb. 3: Effekt von Angiotensin II auf mRNA-Expression von Hypertrophiemarkern in H9C2-Zellen. Inkubation von H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) erhöhte signifikant die mRNA-Expression von myosin light chain-2 (MLC-2), atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) und β -myosin heavy chain (β -MHC). (n=5 für MLC-2, ANP; n=4 für BNP, β -MHC). **p<0,01.

Western Blot Analysen ergaben des Weiteren, verglichen zur Kontrolle, eine Abnahme der Phosphorylierung des negativen mTOR Regulators TSC-2 in, mit auf gleiche Weise mit Angiotensin II behandelten H9C2-Zellen, auf 55±9% (n=8, p<0,01) (Abb. 4A). In neonatalen Rattenkardiomyozyten verringerte sich, verglichen zur Kontrolle, die Phosphorylierung auf 57,74±6,7% (n=6, p<0,05) (Abb. 4B).

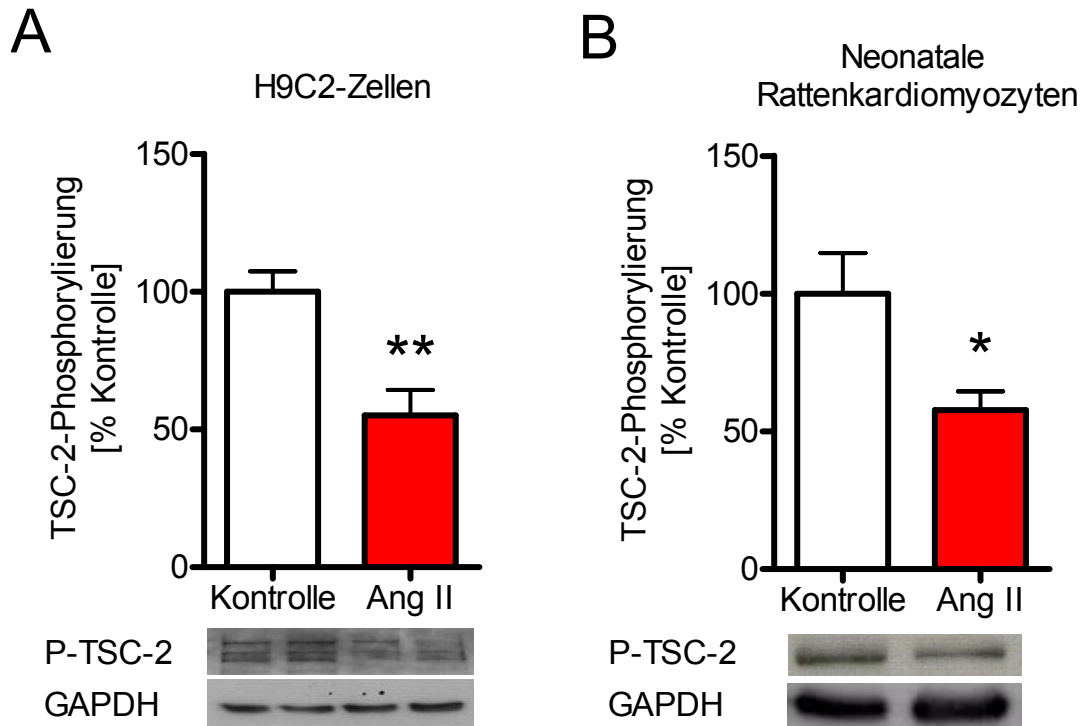


Abb. 4: Effekt von Angiotensin II auf die TSC-2-Phosphorylierung bei H9C2-Zellen und bei neonatalen Rattenkardiomyozyten. Repräsentative Western Blots und Quantifizierung der Abnahme der TSC-2-Phosphorylierung bei Inkubation mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) von **A** H9C2-Zellen (n=8) und von **B** neonatalen Rattenkardiomyocyten (n=6). *p<0,05; **p<0,01.

5.1.2 Angiotensin II steigert den Glukosemetabolismus

Weiterhin wurde der Einfluss von Angiotensin II auf die Substratutilisation untersucht. Hierzu wurden ebenfalls H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) inkubiert, wobei sich nach Auftrennen des Zelllysats in Membran- und Cytosolfractionen in Western Blot Analysen eine Induktion der GLUT4-Membrantranslokation auf $180 \pm 21\%$ (n=4, p<0,01), im Vergleich zur Kontrollgruppe, zeigte (Abb. 5). Diese Beobachtung war von einer Zunahme der zellulären Aufnahme von 2-deoxy-D-2,6-[3 H]-Glukose auf $185 \pm 12\%$ (n=12, p<0,01) in H9C2-Zellen begleitet (Abb. 6).

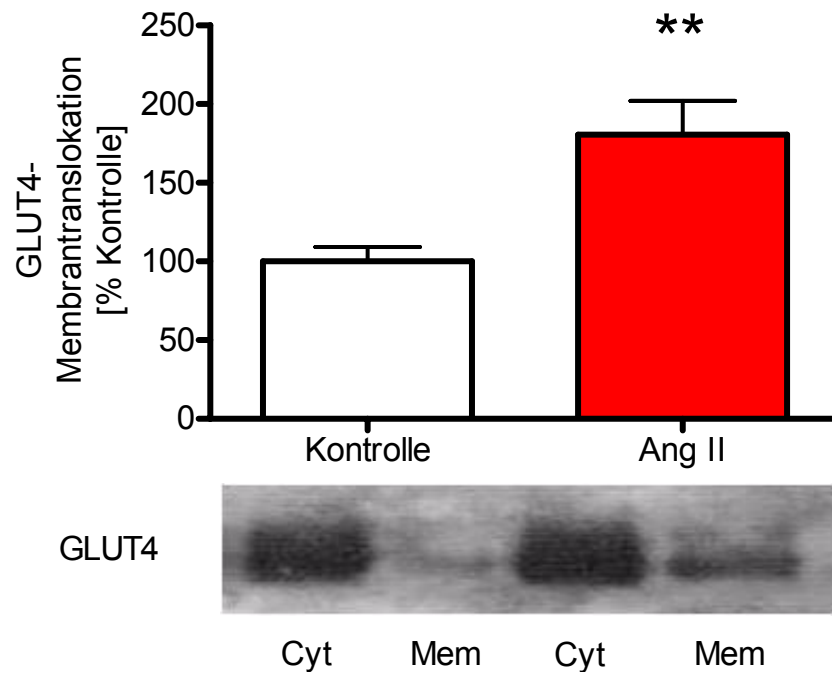


Abb. 5: Effekt von Angiotensin II auf die Membrantranslokation von GLUT4 in H9C2-Zellen. Repräsentativer Western Blot von cytosolischer und membranständiger GLUT4-Fraktion und Quantifizierung der Zunahme der GLUT4-Membrantranslokation nach Behandlung von H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) (n=4). **p<0,01.

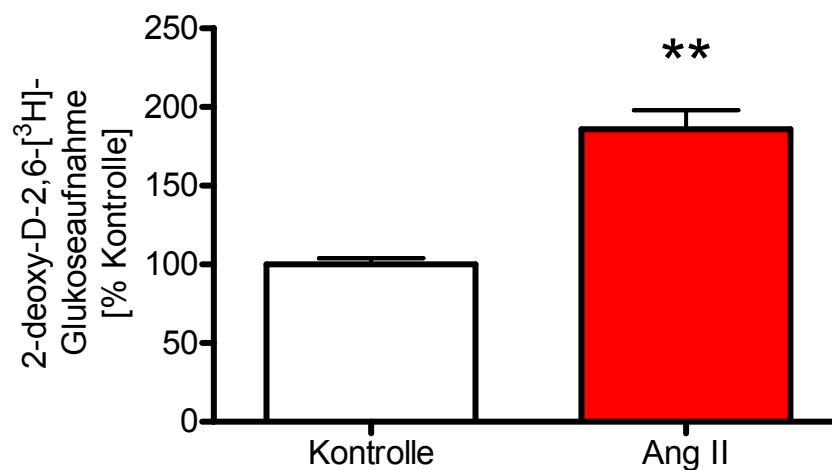


Abb. 6: Effekt von Angiotensin II auf die 3 H-Glukoseaufnahme in H9C2-Zellen. Inkubation von H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) steigerte die 3 H-Glukoseaufnahme (n=12). **p<0,01.

5.1.3 Angiotensin II führt zu Fettsäureakkumulation, erhöht jedoch nicht die Fettsäureaufnahme

Als Nächstes betrachteten wir den Einfluss der Behandlung mit Angiotensin II auf den Fettsäuremetabolismus in H9C2-Zellen. Hierbei zeigte sich, verglichen zur Kontrolle, in der Färbung mit Nilblau eine deutliche Zunahme der intrazellulären Fettsäureakkumulation auf $221 \pm 19\%$ ($n=5$, $p<0,001$) (Abb. 7).

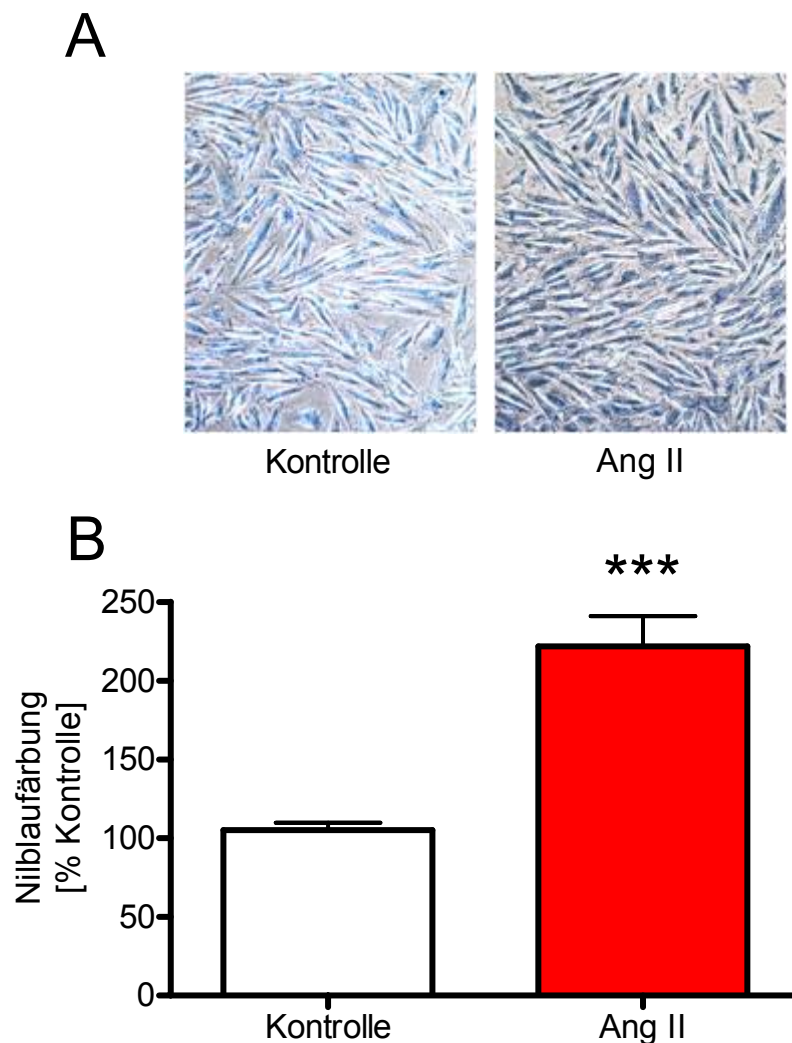


Abb. 7: Effekt von Angiotensin II auf den Fettsäuregehalt in H9C2-Zellen. **A** Repräsentative Nilblaufärbung (40-fache Vergrößerung) von H9C2-Zellen nach Behandlung mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) und **B** Quantifizierung der Nilblaufärbungen zeigten eine Zunahme der intrazellulären Fettsäureakkumulation ($n=5$). *** $p<0,001$.

Weiterhin überprüfen wir den Phosphorylierungszustand der cytosolischen Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), einem Schlüsselenzym des Fettsäuremetabolismus, welches Acetyl-CoA in Malonyl-CoA umwandelt und damit die Bereitstellung von Fettsäuren für den Abbau in der β -Oxidation hemmt. Western Blot Analysen zeigten in H9C2-Zellen nach Behandlung mit Angiotensin II ($1\ \mu\text{M}$) nach zwei Stunden eine Reduktion der Phosphorylierung der ACC auf $64\pm 9\%$ ($n=3$, $p<0,05$). Dieser Effekt war jedoch nach einer Inkubationszeit von vier Stunden nicht mehr signifikant (Abb. 8A). Neonatale Rattenkardiomyozyten zeigten eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der ACC nach Behandlung mit Angiotensin II ($1\ \mu\text{M}$, 4 h) auf $68\pm 11\%$ ($n=4$, $p<0,05$) (Abb. 8B).

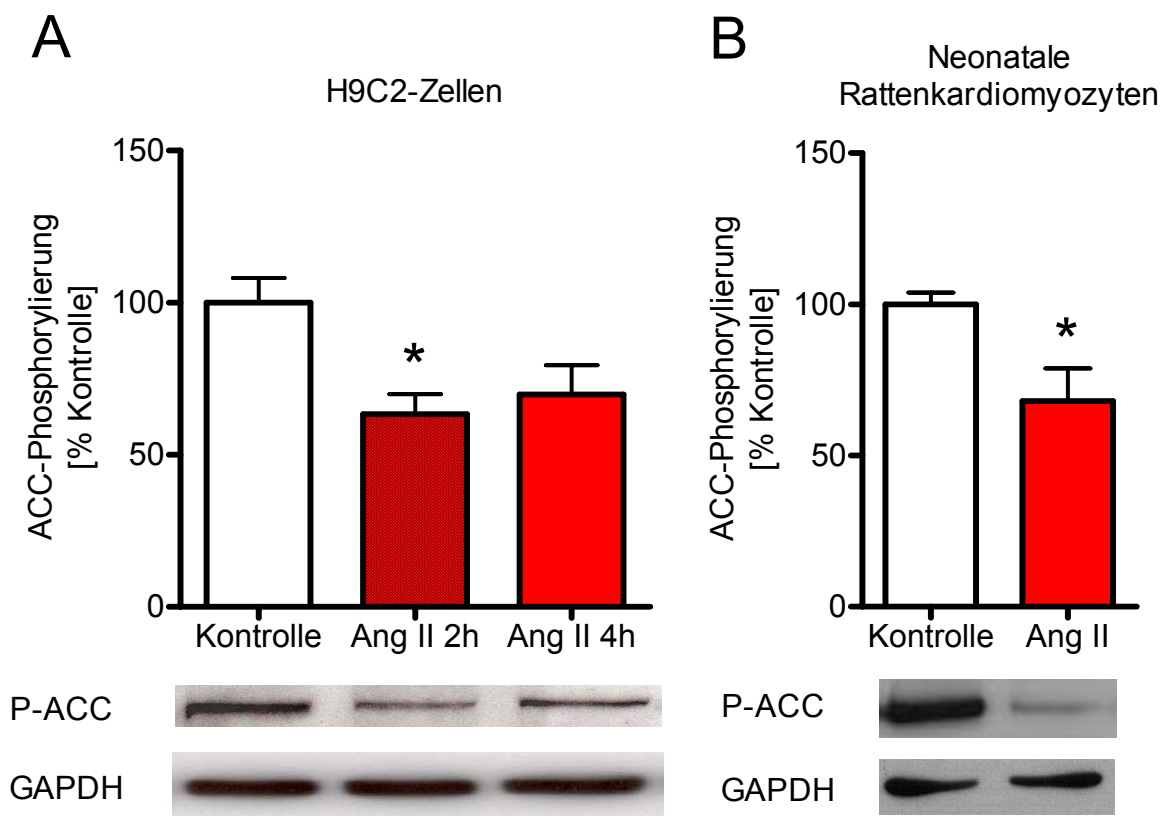


Abb. 8: Effekt von Angiotensin II auf die ACC-Phosphorylierung in H9C2-Zellen und neonatalen Rattenkardiomyozyten. **A** Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung zeigten eine signifikante Reduktion der ACC-Phosphorylierung bei Inkubation mit Angiotensin II ($1\ \mu\text{M}$) von H9C2-Zellen nach zwei Stunden, jedoch nicht mehr nach vier Stunden ($n=3$) **B** Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung zeigten eine signifikante Reduktion der ACC-Phosphorylierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten bei Inkubation mit Angiotensin II ($1\ \mu\text{M}$, 4 h) ($n=4$). * $p<0,05$.

Die Aufnahme von ^{14}C -Palmitinsäure ergab bei den Messungen keinen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten H9C2-Zellen ($n=7$, n.s.) (Abb. 9).

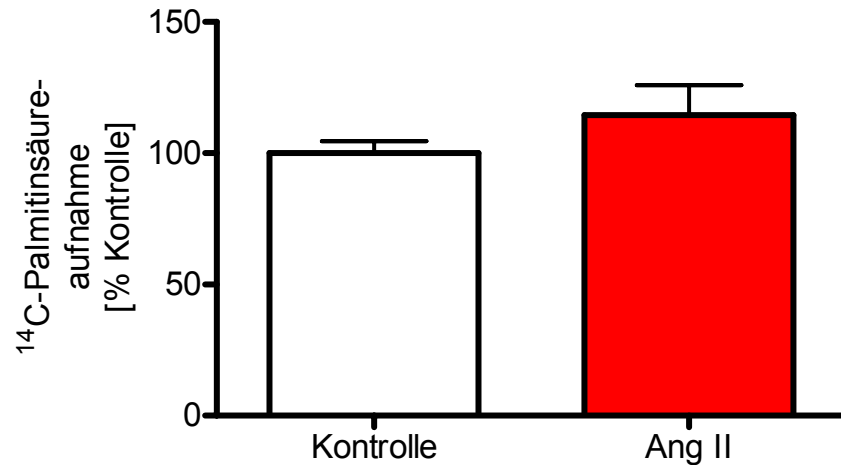


Abb. 9: Effekt von Angiotensin II auf die ^{14}C -Palmitinsäureaufnahme in H9C2-Zellen. Inkubation von H9C2-Zellen mit Angiotensin II ($1\ \mu\text{M}$, 4 h) zeigte keine Änderung der Aufnahme von ^{14}C -Palmitinsäure ($n=7$). n.s.

5.1.4 Angiotensin II reduziert zeit- und dosisabhängig die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase

Um eine mögliche Beteiligung der AMP-aktivierten Proteinkinase zu prüfen, ermittelten wir mittels Western Blot Analysen deren Phosphorylierungszustand. H9C2-Zellen, die mit Angiotensin II stimuliert wurden, wiesen eine zeit- und dosisabhängige Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase auf (Abb. 10A/10B). Die maximale Dephosphorylierung auf $58\pm 4,3\%$ ($p<0,001$) gegenüber der Kontrolle wurde mit $1\ \mu\text{M}$ Angiotensin II bei einer Inkubationszeit von vier Stunden beobachtet. Weitere Western Blot Analysen zeigten mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen die α_2 -Untereinheit keine Änderung der Expression der AMP-aktivierten Proteinkinase in H9C2-Zellen unter dem Einfluss von Angiotensin II (Abb. 10C).

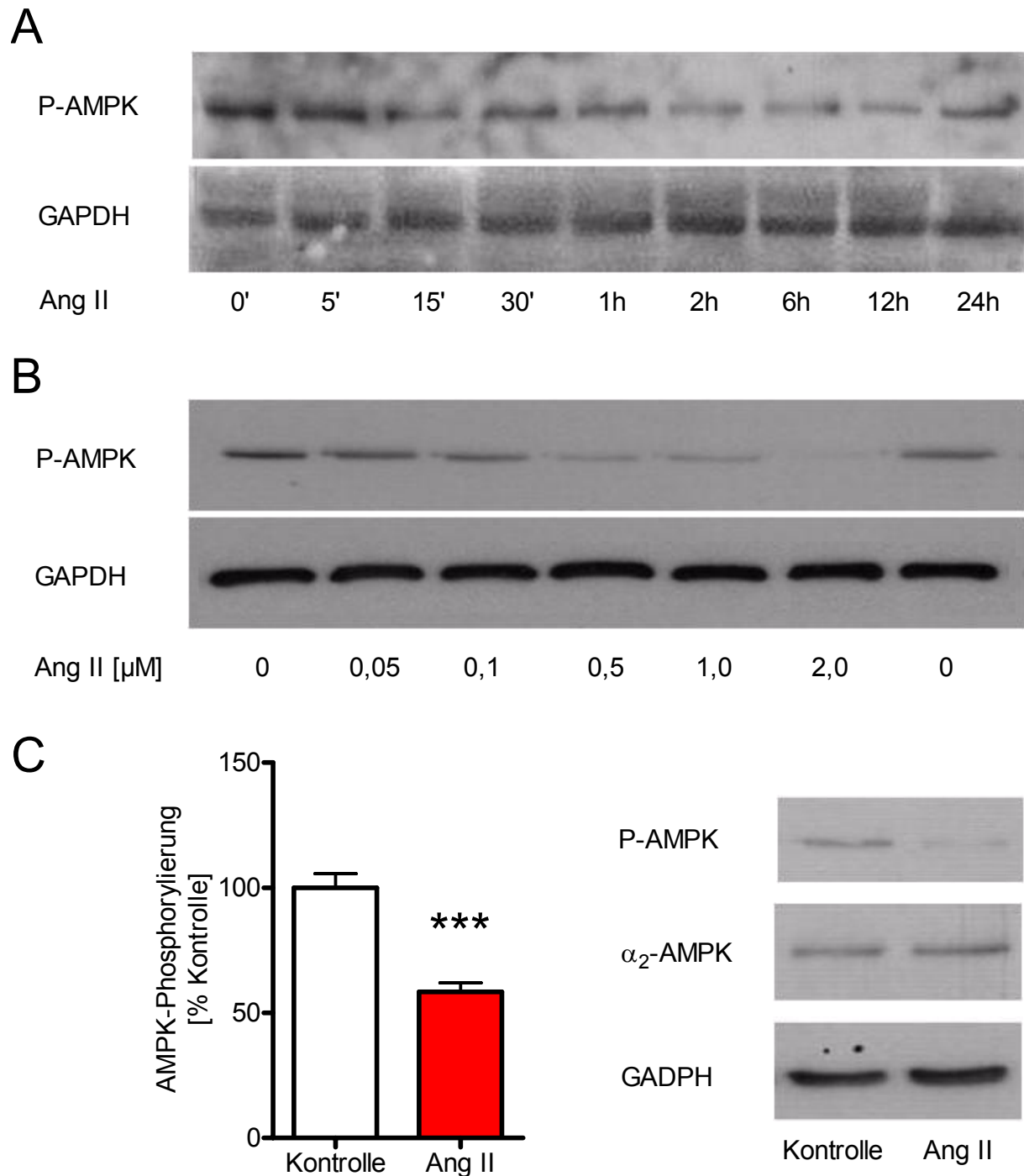


Abb. 10: Effekt von Angiotensin II auf die AMPK-Phosphorylierung in H9C2-Zellen. Repräsentative Western Blots und Quantifizierung zeigten eine **A** zeitabhängige und **B** dosisabhängige Dephosphorylierung der AMPK mit einem **C** maximalen Effekt durch Angiotensin II bei 1 μM für 2-6 h. Die Expression der Gesamt-AMPK, repräsentiert durch die α_2 -Untereinheit, blieb dabei unverändert. *** $p < 0,001$.

Neben den Befunden aus H9C2-Zellen reduzierte Angiotensin II in neonatalen Rattenkardiomyozyten die Phosphorylierung der AMPK auf $51 \pm 9\%$ ($n=6$, $p<0,01$). Auch hier blieb die Expression der α_2 -Untereinheit unverändert (Abb. 11).

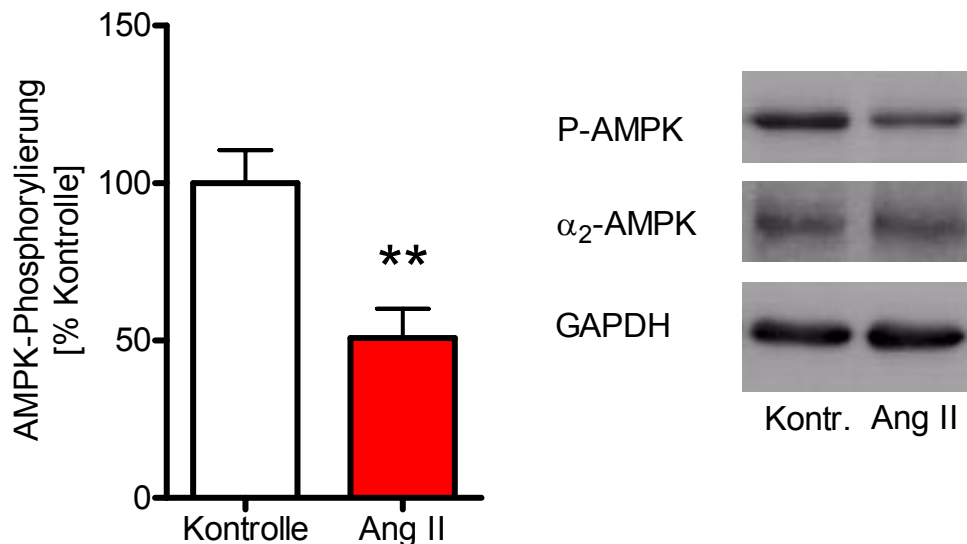


Abb. 11: Effekt von Angiotensin II auf die AMPK-Phosphorylierung in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Inkubation mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) reduzierte die Phosphorylierung der AMPK signifikant ($n=6$). ** $p<0,01$.

5.1.5 AICAR inhibiert die durch Angiotensin II induzierte Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase

Nach den vorangegangenen Experimenten war nun zu prüfen, ob die durch Angiotensin II ausgelöste Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase durch einen Aktivator der Proteinkinase inhibiert werden könnte. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit AICAR (1 mM, 2 h) präinkubiert. Danach wurde Angiotensin II (1 μ M, 4 h) hinzugegeben. Anschließende Western Blot Analysen ergaben, dass die durch Angiotensin II hervorgerufene Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase durch Präinkubation mit AICAR aufgehoben werden konnte. Bei alleiniger Stimulation mit AICAR kam es zu einer Steigerung der Phosphorylierung auf $178,1 \pm 18,5\%$ ($n=4$, $p<0,001$) gegenüber der Kontrolle. Durch Präinkubation mit AICAR wurde die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase, verglichen

zur Kontrolle, auf $155,9 \pm 13,7\%$ ($n=3$, $p<0,05$) gesteigert. Die Expression der α_2 -Untereinheit der AMP-aktivierten Proteinkinase blieb unverändert (Abb. 12).

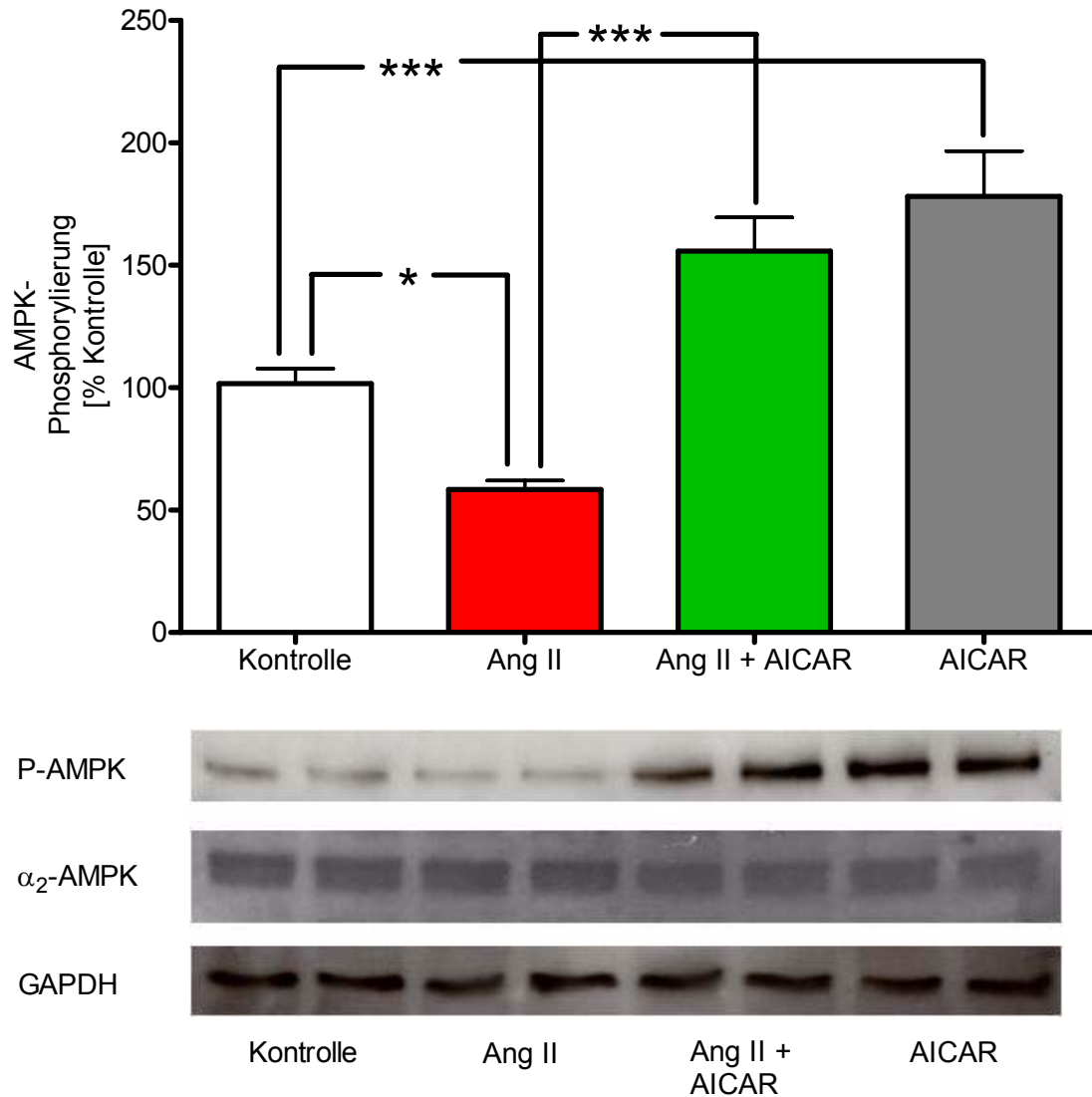


Abb. 12: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die AMPK-Phosphorylierung in H9C2-Zellen. Präinkubation mit AMPK-Aktivator AICAR (1 mM, 2 h) hob die durch Angiotensin II (1 μ M, 4 h) induzierte Dephosphorylierung der AMPK auf, während die Expression der Gesamt-AMPK, repräsentiert durch die α_2 -Untereinheit, unverändert blieb (Kontrolle: $n=7$, Ang II: $n=4$, AICAR: $n=4$, Ang II + AICAR: $n=3$). * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

5.1.6 Effekte von AICAR und Präinkubation von AICAR auf den Metabolismus der Kardiomyozyten

Nun überprüfen wir, ob auch die durch Stimulation mit Angiotensin II ergebenden metabolischen Veränderungen der Zellen durch Präinkubation mit AICAR verhindert werden können. Zu diesem Zweck wurden H9C2-Zellen mit AICAR (1 mM, 4 h) allein oder mit AICAR präinkubiert (1 mM, 2 h) und anschließend mit Angiotensin II (1 μ M) für weitere vier Stunden inkubiert.

Die isolierte Stimulation mit AICAR führte, verglichen zur Kontrolle, zu einer erheblichen Abnahme der GLUT4-Membrantranslokation auf $19 \pm 2\%$ ($n=3$, $p<0,001$). Bei der Präinkubation mit AICAR und nachfolgender Zugabe von Angiotensin II beobachteten wir eine Reduktion der GLUT4-Membrantranslokation auf $43 \pm 3\%$ ($n=3$, $p<0,001$), verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 13).

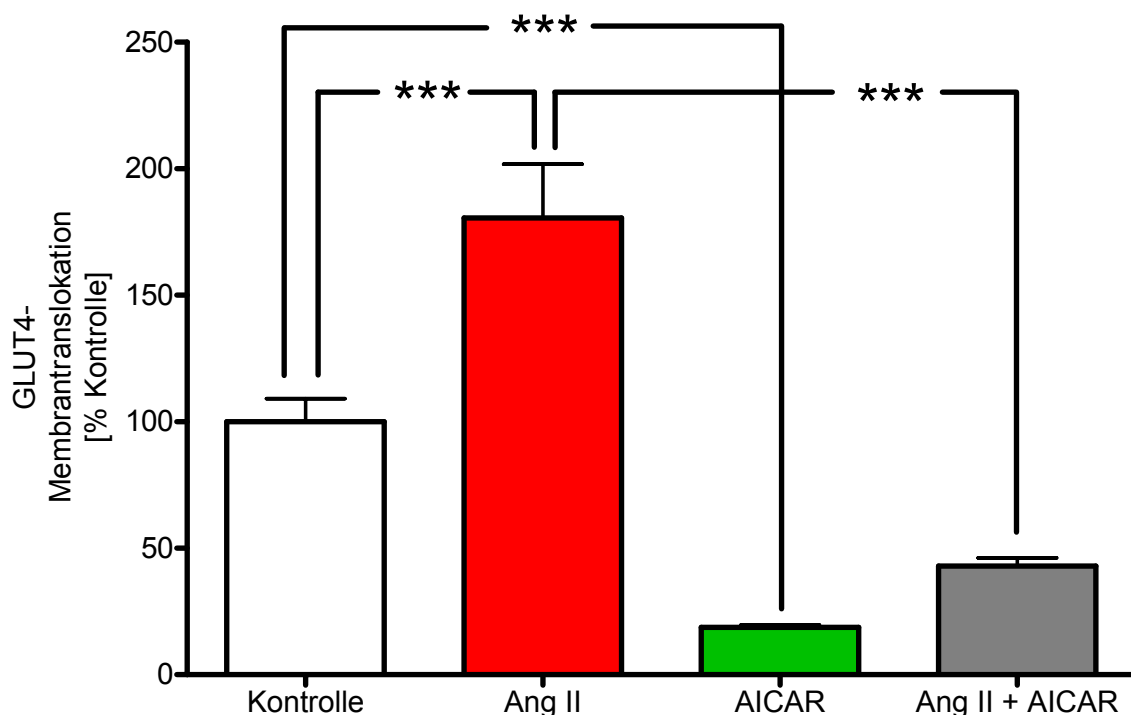


Abb. 13: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die GLUT4-Membrantranslokation in H9C2-Zellen. Präinkubation mit AMPK-Aktivator AICAR (1 mM, 2 h) hob die durch Angiotensin II (1 μ M, 4 h) gesteigerte GLUT4-Membrantranslokation auf (Kontrolle: $n=6$, Ang II: $n=4$, AICAR: $n=3$, Ang II + AICAR: $n=3$). *** $p<0,001$.

Die zelluläre Aufnahme von 2-deoxy-D-2,6- ^3H -Glukose, die durch Angiotensin II auf $160\pm 10\%$ (Kontrolle: $n=34$, Ang II: $n=21$, $p<0,001$) gesteigert worden war, wies sowohl bei isolierter AMPK-Stimulation als auch bei Präinkubation mittels AICAR und anschließender Behandlung mit Angiotensin II keine signifikanten Veränderungen in Bezug zur Kontrollgruppe auf (Abb. 14). AICAR verhinderte somit die durch Angiotensin II induzierte vermehrte Glukoseaufnahme.

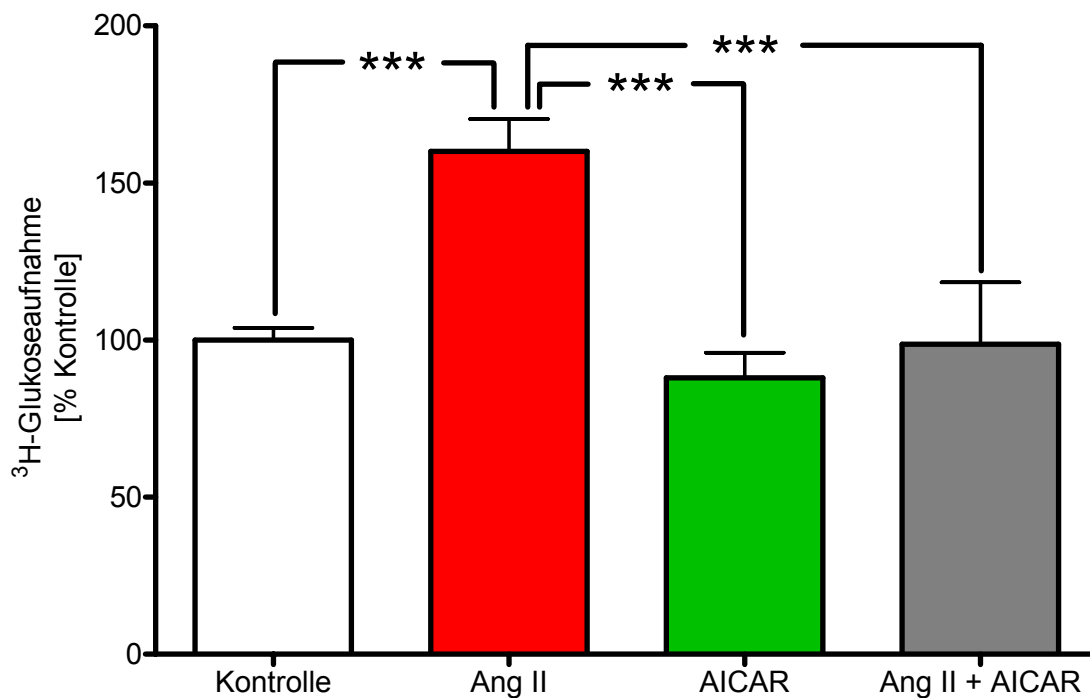


Abb. 14: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die ^3H -Glukoseaufnahme in H9C2-Zellen. Präinkubation mit AICAR (1 mM, 2 h) verhinderte die durch Angiotensin II (1 μM , 4 h) induzierte Glukoseaufnahme (Kontrolle: $n=34$, Ang II: $n=21$, AICAR: $n=11$, Ang II + AICAR: $n=16$). *** $p<0,001$.

Bei der Betrachtung des Fettsäurestoffwechsels führte die Aktivierung der AMPK durch AICAR im Gegensatz dazu zu einem Anstieg der Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase auf $248\pm 23\%$ ($p<0,001$), ein Effekt, der durch Angiotensin II nicht relevant verringert werden konnte (Abb. 15).

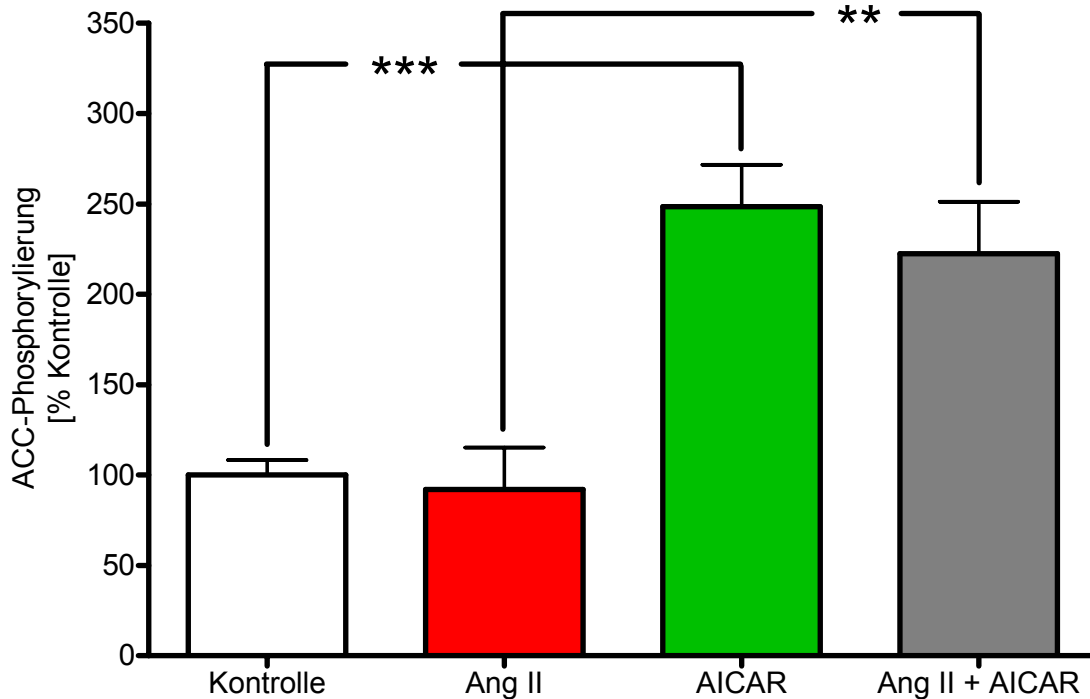


Abb. 15: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die ACC-Phosphorylierung in H9C2-Zellen. Isolierte Inkubation und Präinkubation mit AICAR (1 mM, 2 h) führte zu einer signifikanten Zunahme der Phosphorylierung der ACC in H9C2-Zellen, ein Effekt, der durch Angiotensin II (1 μ M, 4 h) nicht aufgehoben werden konnte (Kontrolle: n=7, Ang II: n=4, AICAR: n=4, Ang II + AICAR: n=6). **p<0,01; ***p<0,001.

AICAR führte, verglichen zur Kontrolle, auch zu einer Zunahme der 14 C-Palmitinsäureaufnahme auf $160 \pm 17\%$ (Kontrolle: n=6, AICAR: n=5, p<0,01). Durch Angiotensin II wurde dieser Effekt partiell, jedoch signifikant auf $132 \pm 7\%$ (n=6, p<0,05) verringert (Abb. 16).

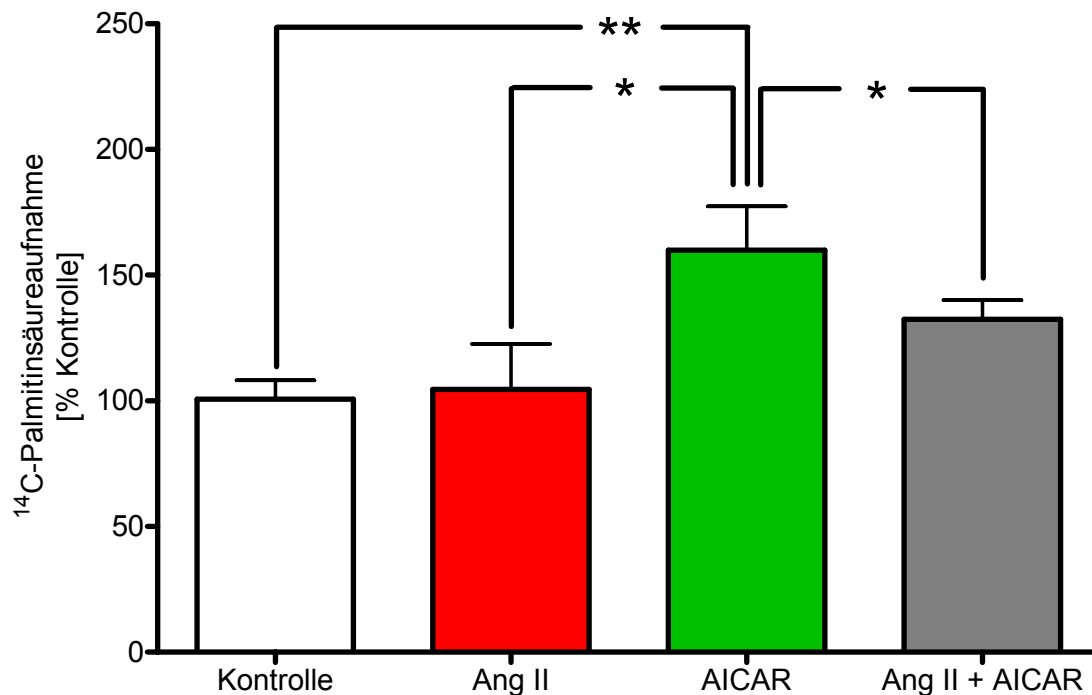


Abb. 16: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die ¹⁴C-Palmitinsäureaufnahme in H9C2-Zellen. Isolierte Inkubation und Präinkubation mit AICAR (1 mM, 2 h) führten zu einer signifikanten Zunahme der ¹⁴C-Palmitinsäureaufnahme in H9C2-Zellen. Angiotensin II (1 µM, 4 h) reduzierte signifikant diesen Effekt (Kontrolle: n=6, Ang II: n=5, AICAR: n=6, Ang II + AICAR: n=4). *p<0,05; **p<0,01.

Um die unterschiedliche Regulierung der Fettsäureaufnahme und der Fettsäureoxidation durch Angiotensin II zu klären, führten wir Nilblaufärbungen durch. Dabei zeigte, verglichen zur Kontrolle, die Behandlung von H9C2-Zellen mit Angiotensin II (1 µM, 4 h) eine signifikante Zunahme der Fettsäuren auf $221 \pm 21\%$ (n=5, p<0,001), die durch Präinkubation mit AICAR (1 mM, 2 h) signifikant auf $130 \pm 11\%$ (n=4, p<0,01) verringert werden konnte (Abb. 17).

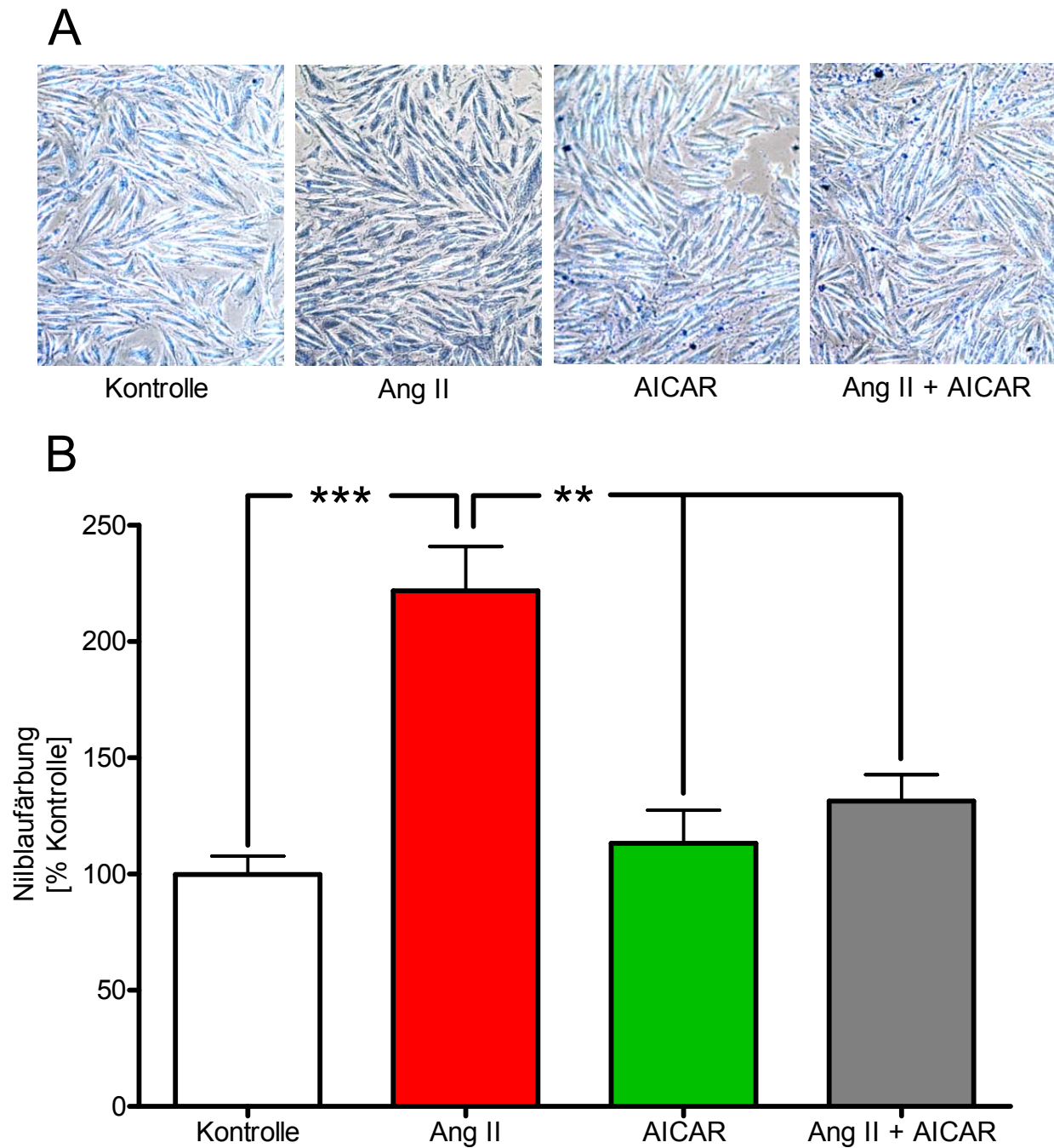


Abb. 17: Effekt der Präinkubation von AICAR auf den Fettsäuregehalt in H9C2-Zellen. **A** Repräsentative Nilblaufärbung (40-fache Vergrößerung) und **B** Quantifizierung zeigten eine Reduktion des Fettsäuregehalts in H9C2-Zellen bei Präinkubation mit AICAR (1 mM, 2 h) vor Inkubation mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) (Kontrolle n=5, Ang II: n=5, AICAR n=4, Ang II + AICAR: n=4). **p<0,01; ***p<0,001.

5.1.7 AICAR verhindert die durch Angiotensin II induzierte Proteinsynthese und die Expression von Hypertrophiemarkern

Nachdem durch eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase mittels AICAR die hervorgerufenen Stoffwechselveränderungen durch Angiotensin II aufgehoben werden konnten, war es nun von Interesse, ob auch die durch Angiotensin II gesteigerte Proteinsynthese sowie die Expression der Hypertrophiemarker durch eine Aktivierung der AMPK verhindert werden können. Hierzu wurde vor der Stimulation mit Angiotensin II (1 μ M, 4 h) eine Präinkubation mit AICAR (1 mM, 1 h) durchgeführt. Die angefertigten Western Blot Analysen zeigten eine gesteigerte Phosphorylierung von TSC-2 durch Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase mittels AICAR auf $285 \pm 38\%$ ($p < 0,001$), im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch Präinkubation mittels AICAR konnte die durch Angiotensin II induzierte Dephosphorylierung von TSC-2 inhibiert werden ($p < 0,001$) (Abb. 18).

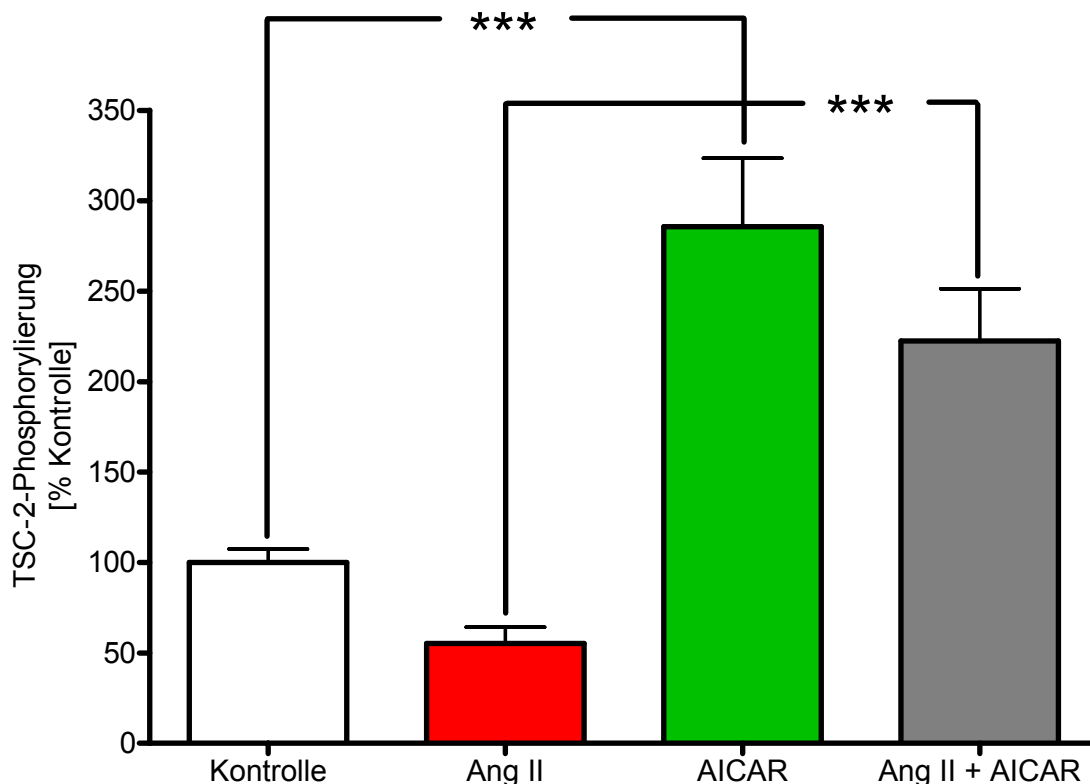


Abb. 18: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die TSC-2-Phosphorylierung in H9C2-Zellen. Präinkubation mit AICAR (1 mM, 1 h) verhinderte die durch Angiotensin II induzierte Reduktion der TSC-2-Phosphorylierung (n=8). *** $p < 0,001$.

Ebenfalls konnte, verglichen zur Kontrolle, durch die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase mittels AICAR die mRNA-Expression der Gene ANP, BNP und β -MHC signifikant verringert werden. Für MLC-2 wurde eine entsprechende Tendenz ohne Signifikanz erreicht (Abb. 19).

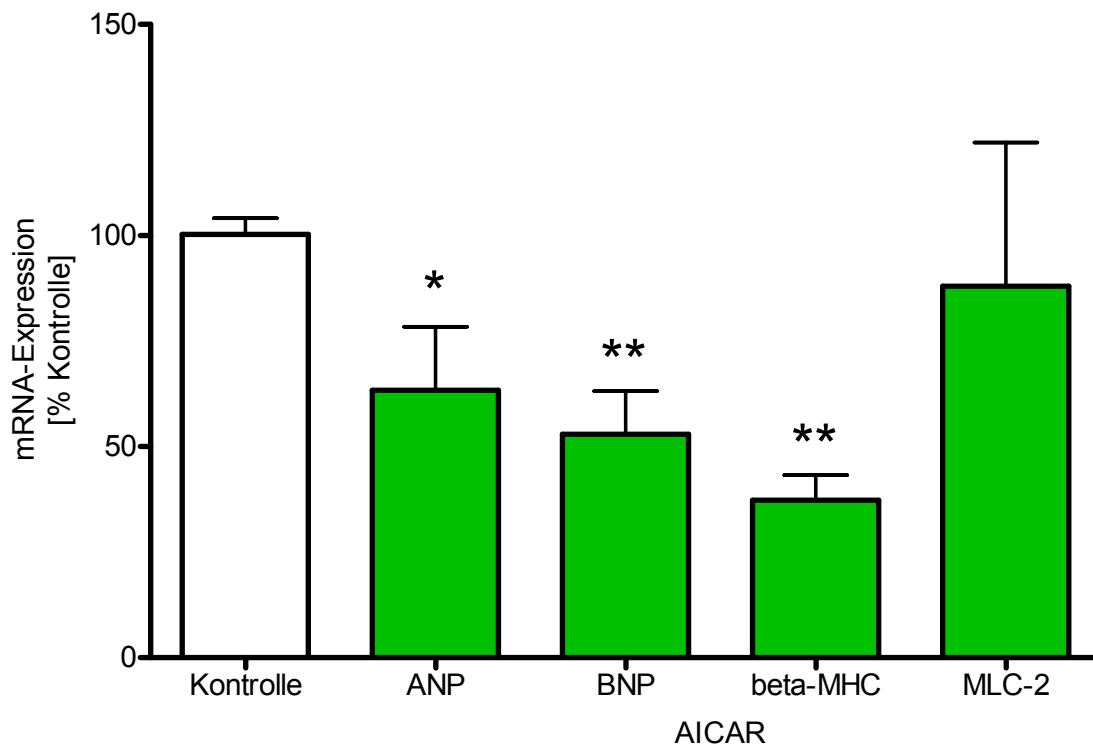


Abb. 19: Effekt der Inkubation von AICAR auf die mRNA-Expression von Hypertrophiemarkern in H9C2-Zellen. Inkubation mit AICAR (1 mM, 2 h) reduzierte die Expression der Hypertrophiemarker ANP, BNP und β -MHC signifikant, verglichen zur Kontrolle (n=6 pro Gruppe). AICAR zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Expressierung von MLC-2 (n=4). *p<0,05; **p<0,01.

Schließlich wurde der Einfluss einer AMPK-Aktivierung auf die Angiotensin II induzierte Proteinsynthese untersucht. Die durch Angiotensin II gesteigerte ^3H -Leucin-Inkorporation konnte durch die Präinkubation mit AICAR (1 mM, 4 h) wirksam verringert werden (n=4, p<0,01). Eine isolierte Stimulation mit AICAR zeigte hier keinen Effekt (Abb. 20).

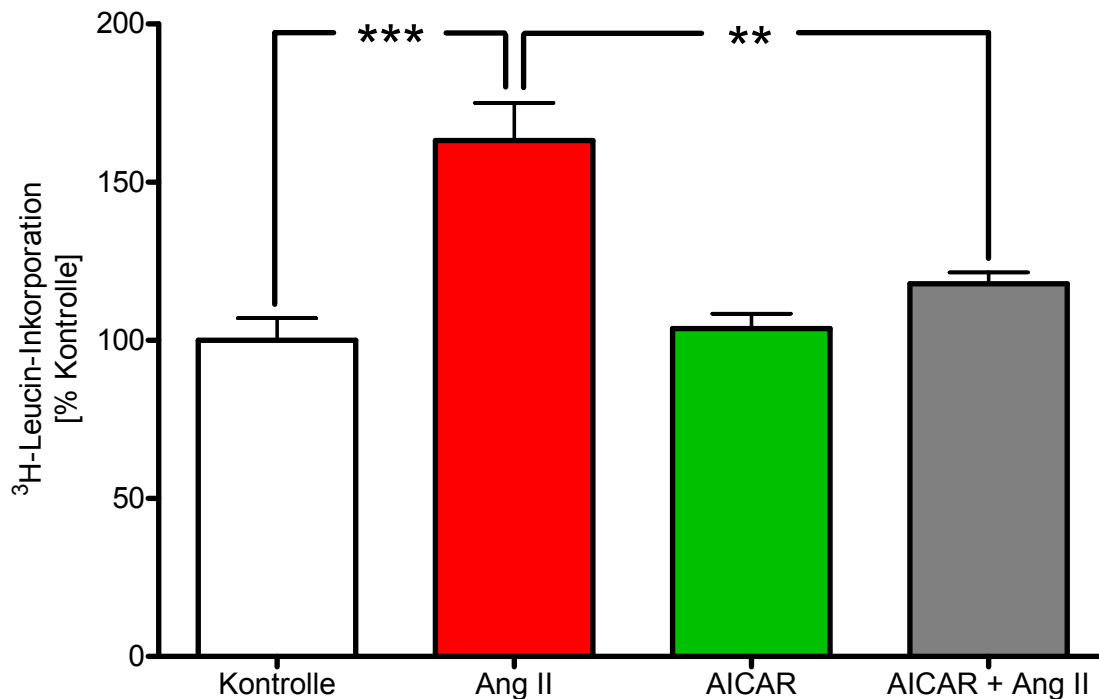


Abb. 20: Effekt der Präinkubation von AICAR auf die ³H-Leucin-Inkorporation in H9C2-Zellen. Präinkubation mit AICAR (1 mM, 4 h) reduzierte die durch Angiotensin II (1 µM, 6 h) induzierte ³H-Leucin-Inkorporation (Kontrolle: n=6, Ang II: n=4, AICAR: n=6, Ang II + AICAR: n=4). **p<0,01; ***p<0,001.

5.2 Tierexperimente

5.2.1 Kurzzeitige Nachlasterhöhung durch Aortenligatur

Um die Befunde der metabolischen Schlüsselenzyme *in vivo* zu überprüfen, wurde durch eine kurzzeitige Nachlasterhöhung mittels Aortenligatur über 30 Minuten ein energetischer Stress für das Myokard induziert.

Eine erfolgreiche Aortenligatur wurde definiert als Anstieg des linksventrikulären Drucks auf mindestens 200%. Analysiert wurden die Tiere, die diese Nachlasterhöhung kompensierten, die daraus resultierende Erhöhung des LVEDP wieder reduzierten und eine signifikante Erhöhung des Lungenwassers verhindern konnten (Abb. 21).

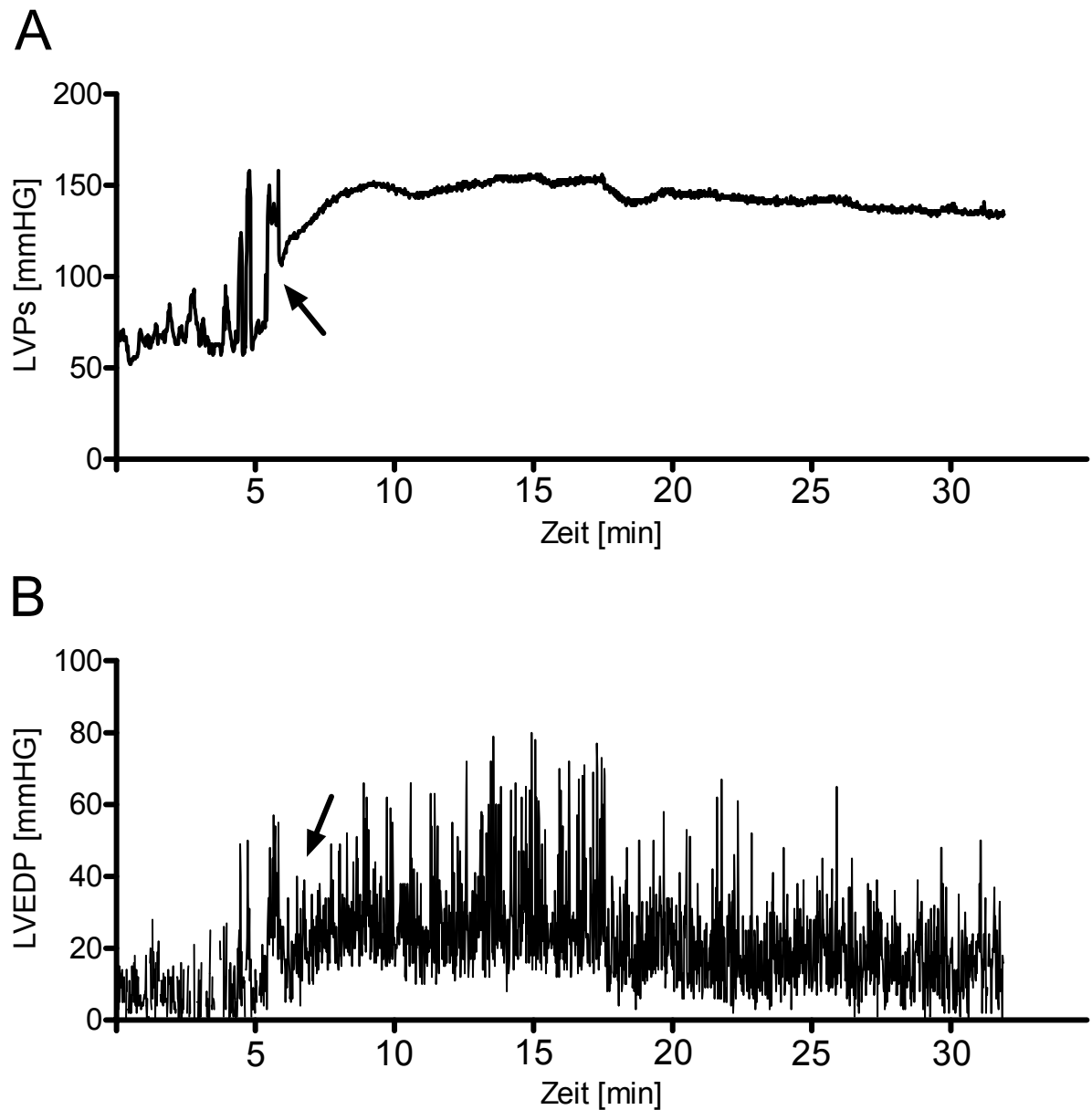


Abb. 21: LVPs und LVEDP während kurzzeitiger Nachlasterhöhung. Repräsentative Aufzeichnungen der Druckverhältnisse nach Aortenligatur für 30 Minuten zeigten, verglichen zu scheinooperierten Tieren, eine Erhöhung des **A** maximal linksventrikulären systolischen Drucks (LVPs) auf mindestens 200% und des **B** linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) auf 200-400% (→ Zeitpunkt der Aortenligatur).

5.2.2 Kurzzeitige Nachlasterhöhung führt zu Dephosphorylierung der AMP-aktivierten Proteinkinase

Eine kurzzeitige Nachlasterhöhung ging, verglichen zu Kontrolltieren, mit einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung der AMPK auf $9\pm 4\%$ (Kontrolle: $n=3$, TAC: $n=4$, $p<0,05$) einher (Abb. 22).

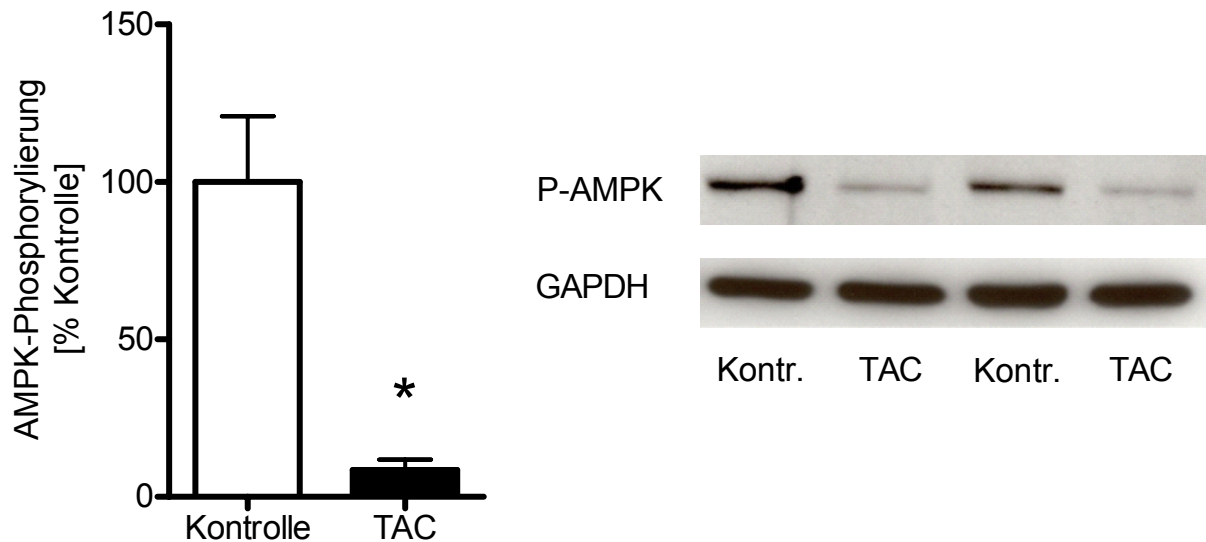


Abb. 22: AMPK-Phosphorylierung nach kurzzeitiger Nachlasterhöhung in C57/B16-Mäusen. Aortenstenosierung über 30 Minuten führte zu einer signifikanten Dephosphorylierung der AMPK (Kontrolle: $n=3$, TAC: $n=4$). * $p<0,05$.

5.2.3 Kurzzeitige Nachlasterhöhung führt zu Dephosphorylierung der ACC und gesteigerter GLUT4-Membrantranslokation

Eine kurzzeitige Nachlasterhöhung ging, verglichen zu Kontrolltieren, mit einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase auf $12\pm 2\%$ (Kontrolle: $n=3$, TAC: $n=4$, $p<0,01$) einher (Abb. 23) und induzierte eine vermehrte Membrantranslokation von GLUT4 auf $238\pm 55\%$ (Kontrolle: $n=3$, TAC: $n=4$, $p<0,05$) (Abb. 24).

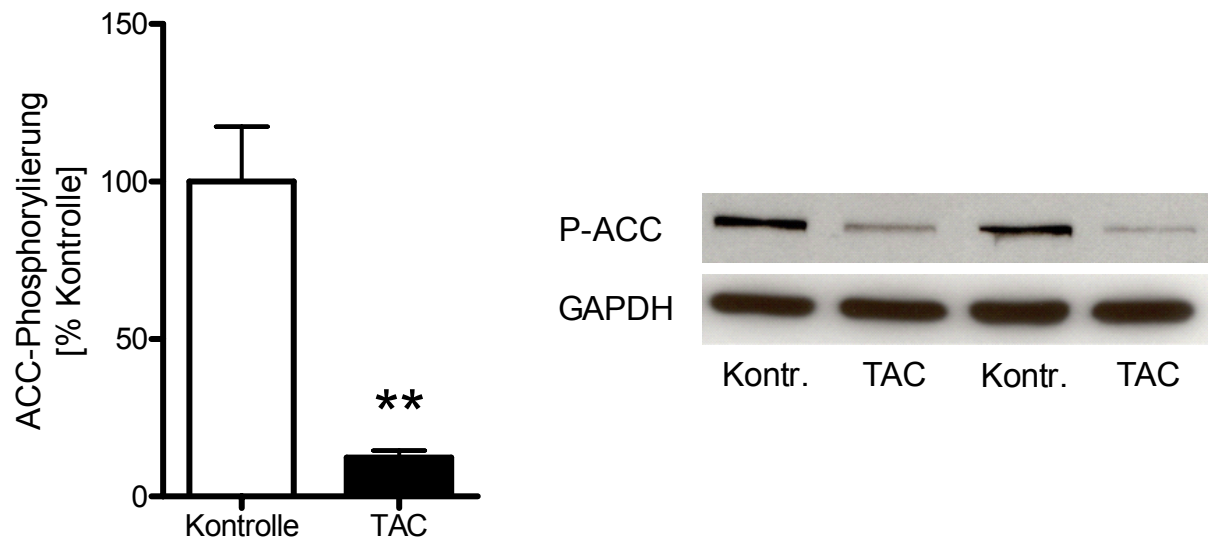


Abb. 23: ACC-Phosphorylierung nach kurzzeitiger Nachlasterhöhung in C57/B16-Mäusen. Aortenstenosierung über 30 Minuten führte zu einer signifikanten Dephosphorylierung der ACC (Kontrolle: n=3, TAC: n=4). **p<0,01.

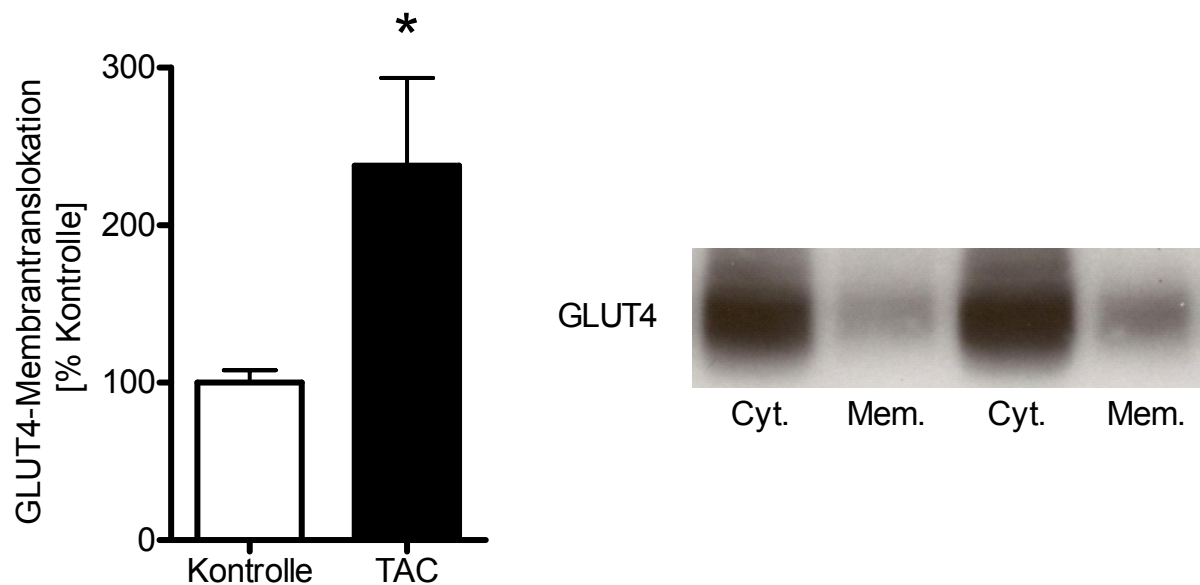


Abb. 24: GLUT4-Membrantranslokation nach kurzzeitiger Nachlasterhöhung in C57/B16-Mäusen. Aortenstenosierung über 30 Minuten führte zu einer signifikanten Zunahme der GLUT4-Membrantranslokation (Kontrolle: n=3, TAC: n=4). *p<0,05.

6 Diskussion

Die bei linksventrikulärer Hypertrophie auftretenden metabolischen Veränderungen sind sehr vielfältig und unterscheiden sich dabei in adaptiven und maladaptiven Formen des Remodellings. Ungeklärt ist, ob diese Stoffwechselveränderungen eine Folge kardialer Hypertrophie sind, oder ob sie selbst die Progression der durch Remodelling resultierenden Herzinsuffizienz bewirken ^{76,77}.

Physiologischerweise generieren Kardiomyozyten, abhängig von der Konzentration freier Fettsäuren im Plasma, 60-90% ihres aeroben ATPs aus der Oxidation von Fettsäuren ¹⁹. Darüber hinaus wird der Anteil der Fettsäureoxidation an der Energiegewinnung auch intrazellulär reguliert: An der Mitochondrienmembran wird die Carnitin-Acyl-Transferase I durch Malonyl-CoA gehemmt, was eine verminderte Fettsäureaufnahme der Mitochondrien und damit eine reduzierte β -Oxidation zur Folge hat ⁷⁸. In Studien, die mäßige Formen der kardialen Hypertrophie untersuchten, wurde eine frühe Suppression der Fettsäureoxidation und eine vermehrte Glukoseverstoffwechselung beobachtet, ähnlich den Befunden aus fetalen Herzen ²⁹. Bei weiterer Progression einer Herzinsuffizienz nimmt zunächst auch die Glukoseverwertung wieder ab, was von einer weiteren Reduktion der Fettsäureoxidation begleitet wird ⁷⁹. Möglicherweise sind dies die Ursachen einer energetischen Erschöpfung des Myokards ⁸⁰. Der Stoffwechsel des Myokards nimmt also eine wichtige Rolle in Bezug auf die Kontraktilität und die Begrenzung myokardialer Schäden ein. Deshalb ist es von Bedeutung die Hauptverursacher des linksventrikulären Remodellings, wie etwa das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), auch auf deren Auswirkungen auf den myokardialen Stoffwechsel zu untersuchen.

Angiotensin II bewirkt direkt und indirekt eine kardiomyozytäre Hypertrophie durch autokrine und parakrine Mechanismen ^{81,82}. Kardiale Hypertrophie und Remodelling werden ferner durch Überexprimierung des AT-I-Rezeptors ausgelöst und durch Behandlung mit ACE-Hemmern oder Angiotensinrezeptorantagonisten (AT-I-Blocker) unterbunden ⁸³. Allerdings sind die Einflüsse von Angiotensin II auf den kardiomyozytären Metabolismus weitgehend unbekannt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen zum ersten Mal, dass die durch Angiotensin II induzierte Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten von erheblichen

Veränderungen in der Substratauswahl mit erhöhtem Glukosestoffwechsel und Akkumulation von Fettsäuren begleitet wird, und dass durch die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase diese Effekte und die Hypertrophie der Kardiomyozyten inhibiert werden können.

In der vorliegenden Studie wiesen mit Angiotensin II behandelte H9C2-Zellen Kennzeichen der Hypertrophie und eine verstärkte Glukoseinkorporation auf, wobei letzteres auf eine vermehrte Membrantranslokation des Glukosetransporters GLUT4 zurückzuführen war. Die Glukoseaufnahme des Herzens wird über die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 reguliert: Während GLUT1 die basale Aufnahme gewährleistet, ist die Expression und Membrantranslokation von GLUT4 durch körperliche Betätigung und Insulin induzierbar ⁸⁴. In unseren Versuchen konnten wir darlegen, dass Angiotensin II ähnliche Effekte auf die Membrantranslokation von GLUT4 hat. Diese Beobachtung entspricht der vermehrten Glukoseutilisation bei Nachlasterhöhung, z.B. bei arterieller Hypertonie ⁸⁵. Die gesteigerte Glukoseaufnahme hat möglicherweise einen adaptiven Charakter für die Zelle, denn die ATP-Produktion aus Glukose verbraucht weniger Sauerstoff als die aus Fettsäuren ⁸⁶. Andererseits erbringt die Oxidation von einem Mol Kohlenstoff aus Fettsäuren 29% mehr ATP als die aus Glukose, so dass unter ausreichendem Sauerstoffangebot die Verstoffwechselung von Fettsäuren erheblich effizienter ist.

Die Experimente ergaben darüber hinaus in H9C2-Zellen und in neonatalen Kardiomyozyten eine Abnahme der Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC). Ferner zeigte die Nilblaufärbung die Akkumulation von Fettsäuren durch Angiotensin II. Bedeutsam ist hierfür die Beobachtung aus unseren *in-vivo* Experimenten, die eine deutliche Dephosphorylierung der ACC nach kurzzeitiger Aortenstenosierung zeigten. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer verminderten Fettsäureoxidation in menschlichen Herzen ⁸⁷ und Nagerherzen mit spezifischer Überexprimierung von Angiotensinogen ⁸⁸. Die daraus resultierenden Konsequenzen auf den Energiehaushalt sind bisher unzureichend bekannt. Die Suppression der Fettsäureoxidation führt zu vermindertem kardialen Sauerstoffverbrauch pro entstehendes ATP und könnte somit protektiv wirken. Allerdings könnte es durch die reduzierte Verwertung von Fettsäuren zu intrazellulärer Lipidakkumulation kommen. Dieser Vorgang führt potentiell zu dem Phänomen der Lipotoxizität ⁸⁹. Mehrere Modelle kardialer Lipidakkumulation – zucker

diabetic fatty rats (ZDF-Ratten), Überexprimierung der kardialen Lipoproteinlipase (LpL), kardiale Überexprimierung des peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α) – zeigen linksventrikuläre Hypertrophie und systolische Dysfunktion bei gesteigerter Apoptoserate⁹⁰⁻⁹². Bei Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie wurden intrazelluläre Triglyceridakkumulationen bei vorliegender Depression der β -Oxidation beobachtet⁹³. In unseren Untersuchungen beobachteten wir in mit Angiotensin II behandelten Kardiomyozyten einen metabolischen Phänotyp, der durch vermehrte Glukoseutilisation und intrazelluläre Lipidakkumulation charakterisiert ist. Entsprechend beobachteten wir bei Wildtypmäusen neben der Dephosphorylierung der ACC eine vermehrte Membrantranslokation von GLUT4 durch kardiale Nachlasterhöhung. Zusammenfassend bedeutet diese Konstellation eine über die Zeit mögliche, relative intrazelluläre Lipidakkumulation, welche in einer Lipotoxizität münden könnte. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung einer signifikant erhöhten Fettsäurefärbung in Kardiomyozyten mittels Nilblau nach Behandlung mit Angiotensin II. Folglich hätte eine Induktion der Fettsäureoxidation, z.B. durch die AMPK nicht nur einen günstigen Einfluss auf die ATP-Ausbeute, sondern würde auch den toxischen Effekten der Lipidakkumulation vorbeugen. Die AMPK ist in verschiedenen Organen ein Hauptstimulator der β -Oxidation⁹⁴. Parallel dazu hemmt sie die kardiale Fettsäurebiosynthese durch Phosphorylierung der Acetyl-CoA-Carboxylase⁹⁵. Unerwarteterweise beobachteten wir in unseren Experimenten, dass die durch Angiotensin II induzierte Hypertrophie und die vermehrte Glukoseutilisation in Kardiomyozyten trotz Stimulation Energie verbrauchender Prozesse wie Zellwachstum und Proteinsynthese mit einer signifikanten Dephosphorylierung der AMPK einherging.

Die Rolle der AMPK im Herzen ist bislang noch unzureichend verstanden. Studien von Russell et al. zeigten eine AMPK-abhängige Zunahme der GLUT4-Membrantranslokation unter Ischämie im working-heart-Modell⁹⁶. Ebenso induziert Ischämie die GLUT4-Membrantranslokation in isolierten Kardiomyozyten⁹⁷. Dagegen sprechen die Ergebnisse von Neely et al., die eine Abnahme der Glukoseaufnahme unter ischämischen Bedingungen beobachteten⁹⁸ und auch neuere Studien, die trotz Aktivierung der AMPK im working-heart-Modell unter Ischämie keine Zunahme der Glukoseaufnahme beobachteten⁹⁹.

Inkonsistent sind neben den Daten für die AMPK auch die Befunde bezüglich der ACC. Frederich et al. zeigten eine negative Korrelation zwischen AMPK und ACC im

Herzen ¹⁰⁰. Entsprechendes konnten Park et al. im trainierten Skelettmuskel aufzeigen ¹⁰¹. Aktuellere Daten deuten jedoch darauf hin, dass die Regulation der AMPK und ACC unabhängig voneinander verlaufen kann und im Zusammenhang mit Ausmaß und Dauer des Trainings steht. Beispielsweise zeigten Sriwijitkamol et al., dass es nach leichtem Training von 40 Minuten Dauer bei unveränderter Phosphorylierung der AMPK bereits zu einer Zunahme der Phosphorylierung der ACC im Skelettmuskel kam. Erst nach der Trainingsperiode war die Phosphorylierung der AMPK leicht erhöht, während die Phosphorylierung der ACC wieder der Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt entsprach ¹⁰². Daher scheint die AMPK-abhängige Regulation des Stoffwechsels in verschiedenen Zelltypen, Geweben und Versuchsanordnungen unterschiedlich zu sein. Demzufolge sind tierexperimentelle und klinische Studien von Nöten, um Zellkulturergebnisse zu bestätigen. In unseren Untersuchungen konnten wir Ergebnisse aus Zellkulturen durch *in vivo*-Experimente mit Mäusen bestätigen, die eine ähnliche Regulation des Stoffwechsels nach kurzzeitiger Nachlasterrhöhung des Herzens zeigten.

Um die Kausalität einer AMPK-Regulation auf die beobachteten metabolischen Effekte zu prüfen, behandelten wir Kardiomyozyten vor der Induktion einer Hypertrophie durch Angiotensin II mit AICAR, einem AMP-Analogon, welches allosterisch zu einer Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase führt. Dabei bewirkte die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase eine nicht durch Angiotensin II inhibierbare Zunahme des Phosphorylierungsgrades der Acetyl-CoA-Carboxylase. Diese Beobachtung wurde durch eine vermehrte Aufnahme von Palmitinsäure begleitet. Beide Befunde sprechen für eine vermehrte Aufnahme und intrazelluläre Verstoffwechselung von Fettsäuren, die durch Angiotensin II nur teilweise aufgehoben werden konnten.

Ferner betrachteten wir den Glukosemetabolismus der Kardiomyozyten nach Präinkubation der Zellen mit AICAR. Dabei wurde der Einbau von GLUT4 in die Plasmamembran signifikant reduziert und die vermehrte Glukoseaufnahme unter dem Einfluss von Angiotensin II aufgehoben. Die dabei auffallende Diskrepanz zwischen der Aufrechterhaltung der Glukoseinkorporation und der umfassenden Abnahme der GLUT4-Translokation ist am ehesten durch die Expression anderer Glukosetransporter (z.B. GLUT1) in der Plasmamembran bedingt, die den basalen Glukosebedarf aufrechterhalten ⁸⁴. Um die unerwartete GLUT4-Translokation trotz Deaktivierung der AMPK zu validieren, untersuchten wir auch diesen Signalweg im

Mausmodell der kurzzeitigen Nachlasterhöhung. Diese führte neben der Dephosphorylierung der AMPK zu einer relevanten Translokation von GLUT4 in die Plasmamembran und bestätigt damit die Ergebnisse der Zellkulturexperimente.

Neben den Auswirkungen der AMPK auf den Metabolismus der Kardiomyozyten zeigten sich auch Effekte auf die Proteinbiosynthese und die Expression maladaptiver Hypertrophie anzeigender Gene. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung kardiomyozytärer Hypertrophie übernimmt die mTOR-Signalkaskade¹⁰³, deren Aktivität vor allem über TSC-2 reguliert wird. Die durch Angiotensin II induzierte, verminderte Phosphorylierung von TSC-2 und die daraus resultierende Aktivierung der Proteinbiosynthese durch mTOR konnte durch eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase aufgehoben werden. Darüber hinaus bewirkte die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase mittels AICAR, dass die durch Angiotensin II hervorgerufene für maladaptive Hypertrophie stehende Expression der Gene ANP, BNP, MLC und β -MHC und die Proteinsynthese reduziert wurden.

Diese Studie zeigt, dass die von der AMP-aktivierten Proteinkinase abhängige Substratutilisation eine wichtige Rolle im Rahmen der Hypertrophie von Kardiomyozyten spielt. Die durch Angiotensin II induzierte kardiale Hypertrophie ist von einer Hemmung der AMP-aktivierten Proteinkinase und einer Verschiebung des Stoffwechsels zu vermehrter Glukoseverwertung begleitet. Die Steigerung der Fettsäureoxidation durch die AMP-aktivierte Proteinkinase verhindert die durch Angiotensin II induzierte Hypertrophie der Kardiomyozyten. Die Experimente verifizieren daher die AMP-aktivierte Proteinkinase als ein potentiell Zielprotein für die Therapie einer maladaptiven Myokardhypertrophie.

7 Literaturverzeichnis

1. Kannel,W.B., Gordon,T. & Offutt,D. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann. Intern. Med.* **71**, 89-105 (1969).
2. Levy,D. *et al.* Echocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy: the Framingham Heart Study. *Am. J. Cardiol.* **59**, 956-960 (1987).
3. Vakili,B.A., Okin,P.M. & Devereux,R.B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am. Heart J.* **141**, 334-341 (2001).
4. Sugden,P.H. & Clerk,A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* **76**, 725-746 (1998).
5. Gidh-Jain,M., Huang,B., Jain,P., Gick,G. & El Sherif,N. Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 627-637 (1998).
6. Boluyt,M.O. *et al.* Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ. Res.* **75**, 23-32 (1994).
7. Calderone,A., Takahashi,N., Izzo,N.J., Jr., Thaik,C.M. & Colucci,W.S. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* **92**, 2385-2390 (1995).
8. Yamamoto,K. *et al.* Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* **28**, 988-994 (1996).
9. Hanford,D.S., Thuerauf,D.J., Murray,S.F. & Glembotski,C.C. Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **269**, 26227-26233 (1994).
10. Sadoshima,J. & Izumo,S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* **73**, 413-423 (1993).
11. Brilla,C.G., Matsubara,L.S. & Weber,K.T. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J. Mol. Cell Cardiol.* **25**, 563-575 (1993).
12. Crawford,D.C., Chobanian,A.V. & Brecher,P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ. Res.* **74**, 727-739 (1994).

13. Schmieder, R.E. *et al.* Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation* **94**, 1304-1309 (1996).
14. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1429-1435 (1987).
15. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N. Engl. J. Med.* **325**, 293-302 (1991).
16. Lehman, J.J. & Kelly, D.P. Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail. Rev.* **7**, 175-185 (2002).
17. Kemppainen, J. *et al.* Myocardial and skeletal muscle glucose uptake during exercise in humans. *J. Physiol* **542**, 403-412 (2002).
18. Taegtmeyer, H., Hems, R. & Krebs, H.A. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* **186**, 701-711 (1980).
19. Goldhaber JI. *The Myocardium*. Langer GA (ed.) (**Academic Press**, London, 1997).
20. Kuang, M., Febbraio, M., Wagg, C., Lopaschuk, G.D. & Dyck, J.R. Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation* **109**, 1550-1557 (2004).
21. van der Vusse, G.J., van Bilsen, M. & Glatz, J.F. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc. Res.* **45**, 279-293 (2000).
22. Thampy, K.G. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J. Biol. Chem.* **264**, 17631-17634 (1989).
23. Fischer, Y. *et al.* Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J. Biol. Chem.* **272**, 7085-7092 (1997).
24. de las, F.L. *et al.* Myocardial fatty acid metabolism: independent predictor of left ventricular mass in hypertensive heart disease. *Hypertension* **41**, 83-87 (2003).
25. Kagaya, Y. *et al.* Effects of long-term pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats. A quantitative autoradiographic study. *Circulation* **81**, 1353-1361 (1990).

26. Allard,M.F., Schonekess,B.O., Henning,S.L., English,D.R. & Lopaschuk,G.D. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am. J. Physiol* **267**, H742-H750 (1994).
27. Alaoui-Talibi,Z., Landormy,S., Loireau,A. & Moravec,J. Fatty acid oxidation and mechanical performance of volume-overloaded rat hearts. *Am. J. Physiol* **262**, H1068-H1074 (1992).
28. Remondino,A. *et al.* Altered expression of proteins of metabolic regulation during remodeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 2025-2034 (2000).
29. Taegtmeyer,H. & Overturf,M.L. Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension* **11**, 416-426 (1988).
30. Stapleton,D. *et al.* Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J. Biol. Chem.* **271**, 611-614 (1996).
31. Carling,D. *et al.* Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* **269**, 11442-11448 (1994).
32. Woods,A. *et al.* Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 28434-28442 (2003).
33. Verhoeven,A.J. *et al.* The AMP-activated protein kinase gene is highly expressed in rat skeletal muscle. Alternative splicing and tissue distribution of the mRNA. *Eur. J. Biochem.* **228**, 236-243 (1995).
34. Li,J. *et al.* Activation of AMPK alpha- and gamma-isoform complexes in the intact ischemic rat heart. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **291**, H1927-H1934 (2006).
35. Sakamoto,K. *et al.* Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPKalpha2 but not AMPKalpha1. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **290**, E780-E788 (2006).
36. Thornton,C., Snowden,M.A. & Carling,D. Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **273**, 12443-12450 (1998).
37. Chen,Z. *et al.* Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **460**, 343-348 (1999).
38. Iseli,T.J. *et al.* AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J. Biol. Chem.* **280**, 13395-13400 (2005).
39. Scott,J.W. *et al.* CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest* **113**, 274-284 (2004).

40. Gollob, M.H. *et al.* Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1823-1831 (2001).
41. MacRae, C.A. *et al.* Familial Hypertrophic cardiomyopathy with Wolff-Parkinson-White syndrome maps to a locus on chromosome 7q3. *J. Clin. Invest* **96**, 1216-1220 (1995).
42. Carling, D., Zammit, V.A. & Hardie, D.G. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* **223**, 217-222 (1987).
43. Ferrer, A., Caelles, C., Massot, N. & Hegardt, F.G. Activation of rat liver cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase kinase by adenosine 5'-monophosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 497-504 (1985).
44. Yeh, L.A., Lee, K.H. & Kim, K.H. Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *J. Biol. Chem.* **255**, 2308-2314 (1980).
45. Ponticos, M. *et al.* Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.* **17**, 1688-1699 (1998).
46. Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G. & Carling, D. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 659-669 (2000).
47. Adams, J. *et al.* Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci.* **13**, 155-165 (2004).
48. Hawley, S.A. *et al.* Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879-27887 (1996).
49. Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Hardie, D.G. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* **377**, 421-425 (1995).
50. Minokoshi, Y. *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339-343 (2002).
51. Yamauchi, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**, 1288-1295 (2002).
52. Fryer, L.G., Parbu-Patel, A. & Carling, D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **277**, 25226-25232 (2002).

53. Clark,H., Carling,D. & Saggerson,D. Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2215-2224 (2004).
54. Folmes,C.D., Clanachan,A.S. & Lopaschuk,G.D. Fatty acids attenuate insulin regulation of 5'-AMP-activated protein kinase and insulin cardioprotection after ischemia. *Circ. Res.* **99**, 61-68 (2006).
55. Watt,M.J., Steinberg,G.R., Chen,Z.P., Kemp,B.E. & Febbraio,M.A. Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes. *J. Physiol* **574**, 139-147 (2006).
56. Kudo,N., Barr,A.J., Barr,R.L., Desai,S. & Lopaschuk,G.D. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **270**, 17513-17520 (1995).
57. Luiken,J.J. *et al.* Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* **52**, 1627-1634 (2003).
58. Russell,R.R., III, Bergeron,R., Shulman,G.I. & Young,L.H. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol* **277**, H643-H649 (1999).
59. Marsin,A.S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* **10**, 1247-1255 (2000).
60. Browne,G.J., Finn,S.G. & Proud,C.G. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J. Biol. Chem.* **279**, 12220-12231 (2004).
61. Chan,A.Y., Soltys,C.L., Young,M.E., Proud,C.G. & Dyck,J.R. Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* **279**, 32771-32779 (2004).
62. Horman,S. *et al.* Myocardial ischemia and increased heart work modulate the phosphorylation state of eukaryotic elongation factor-2. *J. Biol. Chem.* **278**, 41970-41976 (2003).
63. Inoki,K., Zhu,T. & Guan,K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577-590 (2003).
64. Kudo,N. *et al.* Characterization of 5'AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 67-75 (1996).
65. Dyck,J.R. *et al.* Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur. J. Biochem.* **262**, 184-190 (1999).

66. Witters,L.A. & Kemp,B.E. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 2864-2867 (1992).
67. Yang,J. & Holman,G.D. Long-term metformin treatment stimulates cardiomyocyte glucose transport through an AMP-activated protein kinase-dependent reduction in GLUT4 endocytosis. *Endocrinology* **147**, 2728-2736 (2006).
68. Jefferson,L.S., Wolpert,E.B., Giger,K.E. & Morgan,H.E. Regulation of protein synthesis in heart muscle. 3. Effect of anoxia on protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **246**, 2171-2178 (1971).
69. Garami,A. *et al.* Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell* **11**, 1457-1466 (2003).
70. Schmelzle,T. & Hall,M.N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-262 (2000).
71. Kimes,B.W. & Brandt,B.L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* **98**, 367-381 (1976).
72. Yaffe,D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **61**, 477-483 (1968).
73. Richler,C. & Yaffe,D. The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev. Biol.* **23**, 1-22 (1970).
74. Hescheler,J. *et al.* Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* **69**, 1476-1486 (1991).
75. LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L. & RANDALL,R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
76. Frey,N. & Olson,E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 45-79 (2003).
77. Ritchie,R.H. & Delbridge,L.M. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **33**, 159-166 (2006).
78. Hopkins,T.A., Dyck,J.R. & Lopaschuk,G.D. AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 207-212 (2003).
79. Lei,B. *et al.* Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **36**, 567-576 (2004).

80. Stanley,W.C., Recchia,F.A. & Lopaschuk,G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* **85**, 1093-1129 (2005).
81. Gray,M.O., Long,C.S., Kalinyak,J.E., Li,H.T. & Karliner,J.S. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **40**, 352-363 (1998).
82. Malhotra,R., Sadoshima,J., Brosius,F.C., III & Izumo,S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. *Circ. Res.* **85**, 137-146 (1999).
83. Paradis,P., Dali-Youcef,N., Paradis,F.W., Thibault,G. & Nemer,M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 931-936 (2000).
84. Kraegen,E.W. *et al.* Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem. J.* **295 (Pt 1)**, 287-293 (1993).
85. Sambandam,N., Lopaschuk,G.D., Brownsey,R.W. & Allard,M.F. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail. Rev.* **7**, 161-173 (2002).
86. Grynberg,A. & Demaison,L. Fatty acid oxidation in the heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28 Suppl 1**, S11-S17 (1996).
87. Razeghi,P. *et al.* Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* **104**, 2923-2931 (2001).
88. Pellieux,C. *et al.* Overexpression of angiotensinogen in the myocardium induces downregulation of the fatty acid oxidation pathway. *J. Mol. Cell Cardiol.* **41**, 459-466 (2006).
89. Ingwall,J.S. & Weiss,R.G. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ. Res.* **95**, 135-145 (2004).
90. Zhou,Y.T. *et al.* Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 1784-1789 (2000).
91. Yagyu,H. *et al.* Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J. Clin. Invest* **111**, 419-426 (2003).
92. Finck,B.N. *et al.* The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **109**, 121-130 (2002).
93. Tomita,T., Wilson,L. & Chiga,M. Idiopathic dilated cardiomyopathy--an evidence of abnormal lipid accumulation accumulation in myocardium. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* **3**, 81-85 (1990).

94. Winder, W.W. *et al.* Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J. Appl. Physiol* **82**, 219-225 (1997).
95. Saddik, M., Gamble, J., Witters, L.A. & Lopaschuk, G.D. Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J. Biol. Chem.* **268**, 25836-25845 (1993).
96. Russell, R.R., III *et al.* AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J. Clin. Invest* **114**, 495-503 (2004).
97. Sun, D., Nguyen, N., DeGrado, T.R., Schwaiger, M. & Brosius, F.C., III. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* **89**, 793-798 (1994).
98. Neely, J.R., Rovetto, M.J., Whitmer, J.T. & Morgan, H.E. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart. *Am. J. Physiol* **225**, 651-658 (1973).
99. Omar, M.A., Fraser, H. & Clanachan, A.S. Ischemia-induced activation of AMPK does not increase glucose uptake in glycogen-replete isolated working rat hearts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **294**, H1266-H1273 (2008).
100. Frederich, M. & Balschi, J.A. The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **277**, 1928-1932 (2002).
101. Park, S.H. *et al.* Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J. Appl. Physiol* **92**, 2475-2482 (2002).
102. Sriwijitkamol, A. *et al.* Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. *Diabetes* **56**, 836-848 (2007).
103. McMullen, J.R. *et al.* Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* **109**, 3050-3055 (2004).

8 Dank

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Ulrich Laufs für die Überlassung des interessanten Themas und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seiner Erfahrung und Ideen immer wieder vorangetrieben.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. Bettina J. Stuck bedanken, die mich jederzeit tatkräftig und moralisch unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, insbesondere der medizinisch-technischen Assistentin Ellen Becker für ihren jederzeit tatkräftigen Beistand und der freundlichen Zusammenarbeit.

Herrn Dr. med. Heiko Kilter und der medizinisch-technischen Assistentin Julia Michaeli danke ich für die Überlassung und Isolierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten und der stets unkomplizierten Zusammenarbeit.

Zudem danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und somit den Weg für diese Arbeit geebnet haben.

9 Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten

<i>Name</i>	Lenski
<i>Vorname</i>	Matthias
<i>Anschrift</i>	Saarbrücker Str. 25 66424 Homburg/Saar
<i>Geburtsdatum</i>	20.02.1983 in Zweibrücken
<i>Familienstand</i>	ledig
<i>Eltern</i>	Ralph Lenski, Dipl.-Ing. (TU) Astrid Just-Lenski, Schulleiterin

Schulbildung

<i>1989-1995</i>	Grundschule Dellfeld, Dellfeld
<i>1995-2002</i>	Helmholtz-Gymnasium, Zweibrücken
<i>8. März 2002</i>	Allgemeine Hochschulreife

Praktika

<i>April 2002 – Juni 2002</i>	Industriepraktikum bei Deere & Company, Zweibrücken
<i>Mai 2003 – Juli 2003</i>	Pflegepraktikum im Evangelischen Krankenhaus, Zweibrücken

Zivildienst

<i>Juli 2002- April 2003</i>	Zivildienst im Evangelischen Krankenhaus, Zweibrücken
------------------------------	--

Hochschulbildung

<i>ab Oktober 2003</i>	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
------------------------	---

<i>7. September 2005</i>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
<i>April 2006 – August 2008</i>	Promotionsarbeit in der Klinik für Innere Medizin III, Klinische und Experimentelle Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
<i>Ab August 2008</i>	Praktisches Jahr an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
<i>Ab Oktober 2008</i>	Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter in der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs

Famulaturen

<i>März 2006</i>	Famulatur im Fachbereich Kardiologie Uniklinik Homburg/Saar
<i>März 2007</i>	Famulatur im Fachbereich Kardiologie Uniklinik Homburg/Saar
<i>August 2007</i>	Famulatur im Fachbereich Anästhesiologie Uniklinik Homburg/Saar
<i>März 2008</i>	Famulatur im Fachbereich Kardiologie Uniklinik Homburg/Saar

Publikation

Stuck,B.J.*, Lenski,M.*, Böhm,M., Laufs,U. Metabolic switch and hypertrophy of cardiomyocytes following treatment with angiotensin II are prevented by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2008 Sep 19, epub ahead of print (2008).

*Both authors contributed equally to this work.

Abstracts

Stuck,B.J., Lenski,M., Böhm,M., Laufs,U. Metabolische Änderungen sind Grundlage der Angiotensin-vermittelten kardiomyozytären Hypertrophie. Clin Res Cardiol 96: Suppl 1, 74. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie* V951 (2008).

Stuck,B.J., Lenski,M., Kilter,H., Böhm,M. & Laufs,U. Abstract 513: Metabolic Switch and Hypertrophy of Cardiomyocytes Following Angiotensin-treatment are Prevented by Activation of AMP-activated Protein Kinase. *Circulation* **116**, II-90 (2007).

Stuck,B.J., Lenski,M., Böhm,M., Laufs,U. Angiotensin-induced hypertrophy of H9C2-cells is prevented by activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *ESC Heart failure* 2007. Final Prog. Number 187 (2007).

Stuck,B.J., Lenski,M., Böhm,M., Laufs,U. Bedeutung der AMP-aktivierten Proteinkinase für die Angiotensin-vermittelte Modifikation von Energiehaushalt und Proteinsynthese in Kardiomyozyten. Clin Res Cardiol 96: Suppl 1, 73. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie*. P471 (2007).